



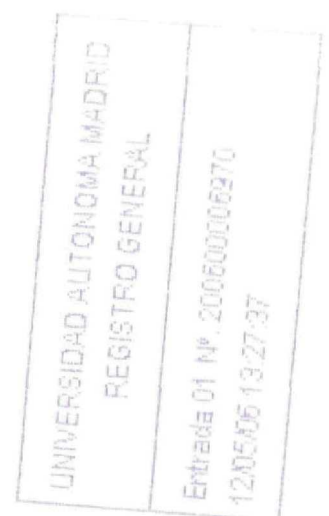
M/
Tesis/
2889

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**MAPEO, IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIOS
DE EXPRESIÓN DEL GEN RESPONSABLE
DE LA SORDERA DFNA44**

TESIS DOCTORAL

Reg. FM. 26.024



SILVIA MODAMIO HØYBJØR

Madrid, 2006

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Sobre Saliente "Cum Laude"
Madrid, 27 de Junio de 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**MAPEO, IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIOS
DE EXPRESIÓN DEL GEN RESPONSABLE
DE LA SORDERA DFNA44**

SILVIA MODAMIO HØYBJØR

Madrid, 2006

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

MAPEO, IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIOS
DE EXPRESIÓN DEL GEN RESPONSABLE
DE LA SORDERA DFNA44

Memoria que, para optar al título de Doctor,
presenta Silvia Modamio Høybjør,
Licenciada en Ciencias Químicas

Directores de Tesis:
Dr. Felipe Moreno Herrero
Dr. Miguel Ángel Moreno Pelayo

Unidad de Genética Molecular
Hospital Ramón y Cajal
Madrid, 2006



Hospital Ramón y Cajal



Don Felipe Moreno Herrero, Doctor en Ciencias Biológicas y Jefe de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, y Don Miguel Ángel Moreno Pelayo, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador FIS-ISCIII en la misma Unidad,

CERTIFICAN:

Que Doña Silvia Modamio Høybjør ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Mapeo, identificación y estudios de expresión del gen responsable de la sordera DFNA44”.

Revisado el presente trabajo, expresamos nuestra conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 27 de Abril de 2006

Dr. Felipe Moreno Herrero
Unidad de Genética Molecular
Hospital Ramón y Cajal, Madrid

Dr. Miguel Ángel Moreno Pelayo
Unidad de Genética Molecular
Hospital Ramón y Cajal, Madrid

A mis padres

A mis hermanos

A Raúl

*“Después del silencio,
lo que está más cerca de expresar lo inexpressable
es la música”*

ALDOUS HUXLEY

Agradecimientos

He de reconocer que siempre he sentido una atracción especial hacia la genética, desde que aprendí las primeras nociones de herencia mendeliana en el instituto. En quinto de carrera, disfruté especialmente las clases de genética molecular y patología molecular. Me fascinaba cómo una molécula tan “simple” como el DNA era capaz de codificar y orquestar de forma tan perfecta todo cuanto somos, y cómo una simple “errata” en este código podía tener consecuencias desastrosas, incluso para la vida. Cuando entré en la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal, en el año 2000, deseaba profundizar en esta molécula y aprender todas las técnicas que se empleaban en la búsqueda y detección de mutaciones causantes de patología. Ahora, en el 2006, reconozco que mis expectativas se han superado con creces: no sólo he aprendido técnicas de genética molecular, sino también a abrir mi mente a otros campos no menos interesantes, como la biología celular, para intentar comprender los mecanismos por los que se produce una patología (que, en definitiva, es la forma de averiguar cómo funcionamos). Y en este sentido, el sentido de la audición es tremendamente agradecido por la gran riqueza genética que existe en el campo de las sorderas. También he aprendido que una gran cosa de dedicarse a la ciencia es que uno siempre se mantiene expectante; a veces es duro, pero la espera siempre merece la pena. Y desde luego, lo que sí merece la pena es compartir el aprendizaje, las ilusiones y las desilusiones con un equipo de personas tan maravilloso como el de la Unidad de Genética Molecular, del que ya me siento como un miembro más de la familia.

Por todo ello, quiero dar las gracias en primer lugar a Felipe, por acogerme en su laboratorio dándome la oportunidad de realizar un sueño, por permitirme trabajar en un tema tan interesante y preocuparse por mi subvención y mi crecimiento como científico.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Miguel Ángel por guiarme a lo largo de estos años, por enseñarme con entusiasmo, por el incontable número de horas que me ha dedicado con paciencia, tanto en la revisión de los experimentos como en la corrección de la tesis, por compartir con alegría los resultados positivos, por apoyarme en los momentos difíciles, por ser un amigo.

No quiero olvidarme de agradecer a Guy por acogerme cálidamente en su equipo en mi breve pero fructífera estancia en Inglaterra, que ha dado finalmente lugar a una parte importante de esta tesis. No sólo agradezco a Guy, sino también a Kevin y Richard, por ayudarme a dar mis primeros pasos en el para mí desconocido mundo del ratón. A Mark quiero agradecerle que me enseñara, a pesar de su escaso tiempo libre, a hacer hibridaciones *in situ*.

Quiero agradecer también a Ignacio por aportar siempre su punto de vista profesional e inteligente, a Francisco por sus protocolos de clonaje y sus discusiones científicas de gran ayuda, a Manuela por su inmensa labor al recolectar los datos familiares y clínicos, a Jaime por aclararme todas las dudas sobre audiología, a Lolo y a Yoli por su inestimable ayuda con el genotipado y la secuenciación, a Carmen Martín y a Marisol por su buen trabajo en la extracción de DNA, a Carmen Valero por la ayuda con el RNA, a Isabel Varela, del IIB, por su colaboración al aportarnos cDNA de ratón.

A mis dos compañeras y amigas desde hace seis años, Ángeles y Montse, les agradezco su colaboración incondicional (me siento en deuda especialmente con Ángeles, por su gran participación en el mapeo e identificación del gen responsable de la sordera DFNA44), y también el apoyo personal que me han brindado a lo largo de todo este tiempo y su gran calidad humana.

Doy gracias al resto de mi equipo, tanto al personal científico como no científico, a los senior y a los más jóvenes, a los que llevan incontables años en la Unidad, a los recién incorporados, a los que ya se han ido y a los que han estado de paso pero han dejado huella: Alba, Alejandra, Ana, Antonio, Araceli, Concha, Dani, Dori, Elena, Elsa, Fernando, Gema, Gemma, Isabel, José Luis, Laura, Leticia, Luis, Marga, Matías, Mirta, Nati, Nela, Ros, Rosa Calvo, Rosa del Campo, Toñi y Vanessa. Tampoco quiero olvidarme de mis compañeras en Sussex, Kala y Gowri, ni de mi amiga en el “exilio”, M^a José. De todos he aprendido algo, científica o personalmente, me han escuchado, me han dado consejos, me han hecho reír.

Quiero expresar mi agradecimiento, antes de terminar, a las entidades que me han subvencionado durante el periodo de mi tesis doctoral: el Ministerio de Educación y Ciencia, la Red TAU-FIS G03/203 del Instituto de Salud Carlos III, la EMBO (*European Molecular Biology Organization*), por permitirme la estancia en Inglaterra, y la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal.

Por último, quiero agradecer a los míos. A mis padres, Paco y Erna, por su cariño y apoyo incondicional, por ser maravillosos padres y amigos. A mis hermanos, Ingrid y Víctor, por llenar mi vida de alegría desde hace 26 años y medio. A Raúl, por su inestimable ayuda informática, pero también, y sobre todo, por estar siempre a mi lado.

Silvia

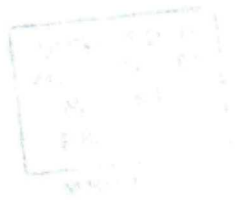
RESUMEN

La sordera neurosensorial no sindrómica (SNNS), en la que la pérdida auditiva es el único síntoma clínico, es un déficit sensorial muy frecuente que se caracteriza por su gran heterogeneidad genética. Hasta la fecha se han descrito 95 *loci* implicados en este trastorno, de los cuales se han identificado 38 genes responsables. El repertorio de productos que éstos codifican es muy variado, y abarca desde proteínas involucradas en el desarrollo temprano del oído interno hasta proteínas necesarias para el mantenimiento de estructuras muy especializadas dentro de la cóclea adulta. En este trabajo, describimos el mapeo de un nuevo *locus* de SNNS de herencia autosómica dominante, DFNA44, en la región cromosómica 3q28-29, y la identificación de la mutación causante de esta patología en el gen *C3orf6*. Este gen codifica Ymer, una proteína de función desconocida recientemente descubierta como un efector fosforilable en tirosina involucrado en la red de señalización del EGF. Con la finalidad de comprender el papel que esta proteína juega en el sistema auditivo, hemos investigado su patrón de expresión en oído interno de ratón. Como resultado, hemos detectado la presencia de cuatro isoformas distintas del gen, cuya expresión no se restringe al oído interno. Hemos concluido también que Ymer es una proteína soluble y citosólica. Asimismo, los experimentos de inmunohistoquímica realizados sobre secciones de oído interno de ratón de distintos estadios pre- y postnatales muestran una expresión dinámica de Ymer que coincide con los eventos de diferenciación de las distintas estructuras durante el desarrollo del oído interno, y que queda restringida a la estría vascular y al epitelio sensorial vestibular en el oído interno adulto. Esto sugiere que Ymer podría jugar un papel importante en el desarrollo del oído interno, así como en el mantenimiento de la función auditiva y vestibular en adulto.

SUMMARY

Non-syndromic sensorineural hearing impairment (NSSHI), in which the hearing loss is associated with no other clinical features, is a very common sensorial disorder characterised by its extremely genetic heterogeneity. To date, as much as 95 *loci* have been described to be implicated in this disorder, for which 38 responsible genes have been identified. The varied repertoire of products they encode ranges from proteins involved in early inner ear development to proteins whose participation is required for the maintenance of highly specialized structures of the mature cochlea. In this work, we describe the mapping of a novel *locus* for autosomal dominant NSSHI, DFNA44, to chromosome 3q28-29, and the identification of the responsible mutation in the gene *C3orf6*. This gene encodes Ymer, a protein of unknown function recently described as a tyrosine-phosphorylated effector involved in EGF-mediated cell signalling. To gain insight into the role that this protein plays in the auditory system, we have investigated its expression pattern in mouse inner ear. As a result, we have detected four different *C3orf6* isoforms, whose expression is not restricted to this organ. We have also concluded that Ymer is a cytosolic soluble protein. Immunohistochemistry performed on mouse inner ear sections from several pre- and postnatal stages reveals that Ymer is dynamically expressed in different structures coinciding with their differentiation events during inner ear development, and that its expression is restricted to the stria vascularis and the vestibular sensory epithelia in the adult inner ear. This suggests that Ymer may play a crucial role both in inner ear development and in the maintenance of the adult auditory and vestibular function.

CLAVE DE ABREVIATURAS



aa	aminoácido
AMV	virus de la mieloblastosis aviar
APS	persulfato amónico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
CCE	célula ciliada externa
CCI	célula ciliada interna
cDNA	DNA complementario
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propanosulfonato
cM	centiMorgan
dB	decibelio
DEPC	dietil pirocarbonato
DFN	<i>locus</i> de sordera no sindrómica ligada al cromosoma X
DFNA	<i>locus</i> de sordera no sindrómica de herencia autosómica dominante
DFNB	<i>locus</i> de sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva
DFNM	<i>locus</i> modificador de sordera
DIG	digoxigenina
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DTT	1,4-ditiotreitol
E(nº)	día embrionario “nº”
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del EGF
EST	secuencia corta expresada (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
FAM	6-carboxifluoresceína
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	fluoresceína 5-isotiocianato
GER	cresta epitelial interna (<i>Greater Epithelial Ridge</i>)
HEX	hexacloro-6-carboxifluoresceína
HNNSAD	hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica dominante
HS	solución de alta concentración salina (<i>High Salt</i>)
HUGO	Organización del Genoma Humano (<i>HUMAN Genome Organisation</i>)
Hz	herzio

IgG	inmunoglobulina G
IPTG	isopropil tiogalactósido
K ⁺	ión potasio
kb	kilobase
kDa	kilodalton
kHz	kiloherzio
LS	solución de baja concentración salina (<i>Low Salt</i>)
mA	miliamperio
MDE	<i>Mutation Detection Enhancement gel solution</i>
mRNA	RNA mensajero
mV	milivoltio
NBT	azul nitro-tetrazolio
O.C.T.	medio de montaje para criotomo (<i>Optimal Cutting temperature medium</i>)
ORF	marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
P(nº)	día postnatal “nº”
pb	par de bases
PBS	tampón fosfato salino
PBT	tampón PBS con Tween 20
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	receptor del PDGF
PKC	proteín kinasa C
PVDF	polivinilo difluorido
RACE	amplificación rápida de extremos de cDNA (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)
RNasa	ribonucleasa
rRNA	RNA ribosómico
RT	transcripción reversa
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (con SDS)
SNP	polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>)
SSC	tampón de citrato sódico salino
STS	secuencia corta y única de DNA (<i>Sequence Tagged Site</i>)
Ta	temperatura de anillamiento

TBE	tampón Tris-Borato-EDTA
TBS	tampón Tris salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TET	tetracloro-6-carboxifluoresceína
TGF- α	factor de crecimiento transformante α
<i>Tgfb2</i>	factor de crecimiento transformante beta 2 (gen de ratón)
TX-100	Triton X-100
U	unidad (de enzima)
UTR	región no traducida (<i>UnTranslated Region</i>)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
Z	valor de <i>lod score</i>
Z_{\max}	valor de <i>lod score</i> máximo
θ	fracción de recombinación
θ_{\max}	fracción de recombinación para Z_{\max}

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1 Anatomía y funcionamiento del oído en mamíferos	27
1.1 Anatomía general del oído	27
1.2 Desarrollo del oído interno.....	28
1.3 Estructura de la cóclea adulta.....	29
1.3.1 Órgano de Corti	29
1.3.2 Membrana basilar	33
1.3.3 Membrana tectoria.....	33
1.3.4 Estría vascular	34
1.4 Fisiología de la audición.....	34
2 La sordera: aspectos generales	37
2.1 Epidemiología	37
2.2 Clasificación.....	37
3 Genética de las hipoacusias hereditarias	39

OBJETIVOS	47
------------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Estudio de la familia S281	51
1.1 Datos familiares y clínicos	51
1.2 Genotipado	51
1.3 Análisis de ligamiento	52
1.4 Análisis de genes candidatos.....	53
1.4.1 Amplificación por PCR.....	53
1.4.2 Análisis de heterodúplex	54
1.4.3 Secuenciación directa.....	54
1.4.4 Clonaje de la mutación c.1394_1401dup	56
1.4.5 Test diagnóstico para la mutación 1394_1401dup.....	56
2 Análisis del RNA mensajero de <i>C3orf6</i>.....	57
2.1 RT-PCR.....	57
2.2 5' RACE-PCR.....	58

2.3	Hibridación <i>in situ</i>	58
2.3.1	Preparación de las sondas	59
2.3.2	Preparación de las secciones de tejido	60
2.3.3	Hibridación con la sonda y lavados	60
2.3.4	Detección de los híbridos sonda-mRNA	61
3	Análisis de la proteína Ymer	62
3.1	Generación de anticuerpos contra Ymer.....	62
3.2	<i>Western blot</i>	62
3.2.1	Análisis de la especificidad de los anticuerpos.....	62
3.2.2	Análisis de la solubilidad de Ymer	63
3.3	Inmunohistoquímica	63
3.3.1	Preparación de las secciones de tejido	63
3.3.2	Hibridación con el anticuerpo DOY	64
3.3.3	Determinación de la dilución óptima para DOY	64
3.3.4	Ensayo de preabsorción de DOY con los péptidos.....	64
4	Direcciones <i>web</i>.....	65
4.1	Programas de análisis.....	65
4.2	Bases de datos	65

RESULTADOS

1	Mapeo de un nuevo <i>locus</i> de sordera dominante (DFNA44).	
	Identificación del gen responsable	69
1.1	Características clínicas de la sordera en la familia S281	69
1.2	Mapeo del <i>locus</i> DFNA44	71
1.3	Análisis de genes candidatos	72
1.3.1	Exclusión de genes candidatos como responsables de la sordera DFNA44.....	75
1.3.1.1	<i>CLDN16</i>	75
1.3.1.2	<i>FGF12</i>	75
1.3.1.3	<i>IL1RAP</i>	76
1.3.2	Validación del gen <i>C3orf6</i> como responsable de la sordera DFNA44.....	77
1.3.2.1	Proteína codificada por el gen <i>C3orf6</i> : Ymer	80

2	Análisis del RNA mensajero de <i>C3orf6</i> en oído interno de ratón.....	82
2.1	Confirmación de la expresión de <i>C3orf6</i> en oído interno de ratón mediante RT-PCR e hibridación <i>in situ</i>	82
2.2	Identificación de las distintas isoformas de <i>C3orf6</i> en oído interno de ratón mediante RT-PCR	85
3	Estudio de la expresión espacio-temporal de la proteína Ymer en oído interno de ratón	88
3.1	Generación de anticuerpos contra Ymer y comprobación de su especificidad	88
3.2	Análisis de la solubilidad de Ymer.....	89
3.3	Localización de la proteína Ymer en oído interno de ratón mediante inmunohistoquímica	90
 DISCUSIÓN		
1	Papel funcional de <i>C3orf6</i> en el oído interno.....	101
2	¿Cuál es la patofisiología de la mutación c.1394_1401dup en <i>C3orf6</i> ?.....	105
 CONCLUSIONES		
109		
 BIBLIOGRAFÍA		
113		
 ANEXO.....		
123		

INTRODUCCIÓN

1 Anatomía y funcionamiento del oído en mamíferos

1.1 Anatomía general del oído

El sistema auditivo periférico recibe el nombre de oído y consta de tres partes anatómicas bien diferenciadas (ver Figura 1A):

- El **oído externo**, constituido por el pabellón auricular u oreja y el conducto auditivo externo, que está limitado en su parte interna por el tímpano.
- El **oído medio**, que comprende el tímpano o membrana timpánica, la cavidad timpánica (situada dentro del hueso temporal y comunicada con la nasofaringe por medio de la trompa de Eustaquio), y la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo).
- El **oído interno** o laberinto, alojado en el hueso temporal y formado por dos sistemas sensoriales distintos: el vestíbulo (comprendido por el sáculo, el utrículo y los tres canales semicirculares), responsable del equilibrio, y la cóclea, responsable de la audición (Figura 1B). Su función es la de transformar los estímulos mecánicos (sonoros y de aceleración) en impulsos nerviosos, que se transmiten al sistema nervioso central a través de las fibras del octavo par craneal o nervio auditivo. Ambos sistemas están conformados por una serie de conductos y cavidades conectados entre sí y rellenos de endolinfa, que constituyen el laberinto membranoso. Éste, a su vez, se halla sumergido en la perilinfa del laberinto óseo, que se comunica con el oído medio a través de dos orificios: la ventana oval, en la cual se inserta la base del estribo, y la ventana redonda, recubierta de una membrana (Figura 1B).

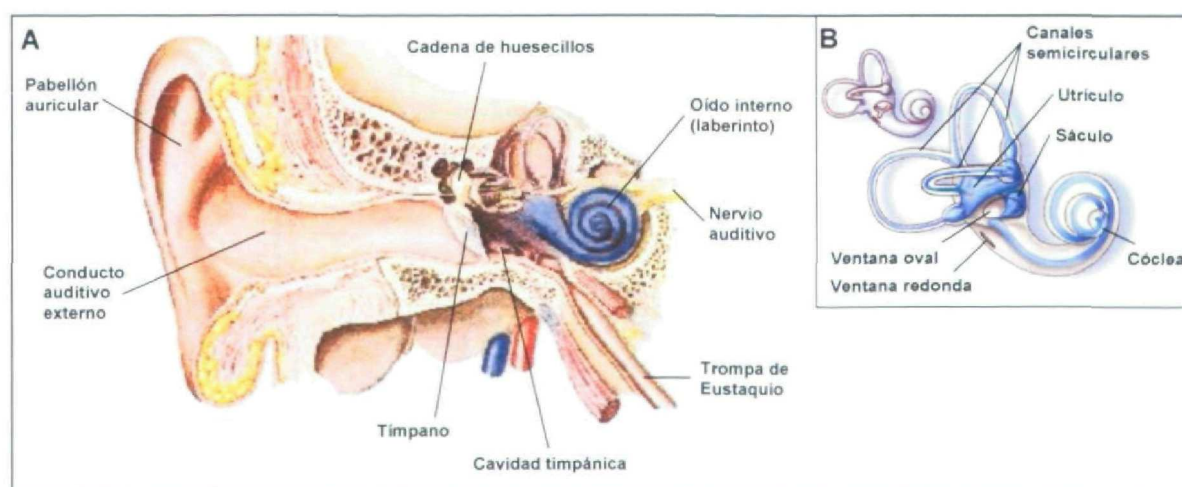


Figura 1. A) Esquema general del oído (adaptado de Alec N Salt, Washington University; URL: <http://oto.wustl.edu/cochlea/>). **B)** Ampliación del oído interno. En la parte superior izquierda se muestra el laberinto óseo; la figura principal representa el laberinto membranoso, con el espacio ocupado por la endolinfa sombreado en azul (adaptado de S Blatrix, CRIC; URL: <http://www.cochlea.org>).

1.2 Desarrollo del oído interno

El primer evento en la morfogénesis del oído interno de mamíferos es la formación de la placoda ótica, un engrosamiento del ectodermo superficial a ambos lados del rombencéfalo (Figura 2a). Posteriormente, la placoda ótica se invagina para formar la fosita ótica (Figura 2b), que justo después del cierre del tubo neural se separa del ectodermo superficial y da lugar a una estructura epitelial hueca llamada vesícula ótica u otocisto (Figura 2c). Inmediatamente después de la formación del otocisto, un grupo de neuroblastos se desprende de su pared anteroventral para formar el ganglio estatoacústico, que inervará el oído interno. A medida que el otocisto se desarrolla, va transformándose en un elaborado laberinto relleno de fluido que comprende las estructuras sensoriales auditivas y vestibulares; al mismo tiempo, el mesénquima circundante es reclutado alrededor para formar el laberinto óseo. El oído interno maduro (Figura 2d) consta de seis epitelios sensoriales, que se localizan, respectivamente, en las tres crestas ampulares (situadas en cada una de las ampollas de los tres canales semicirculares; Figura 2e), que responden a la aceleración angular, en las dos máculas (una del sáculo y otra del utrículo; Figura 2f), que responden a la aceleración lineal, y en el órgano

de Corti situado en la cóclea (Figura 2g), responsable de la audición. Aunque difieren en su función y en su arquitectura específica, estos tres tipos de epitelios presentan una conformación semejante que incluye células sensoriales (ciliadas), células de soporte,

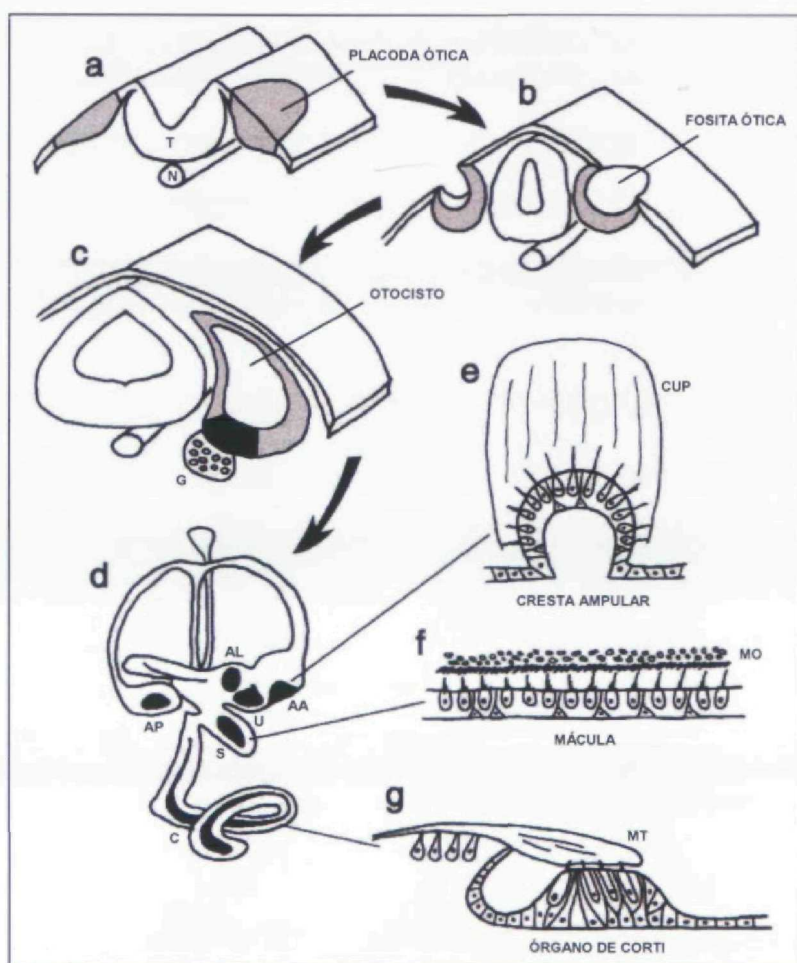


Figura 2. Esquema del desarrollo del oído interno de mamíferos a partir de la placoda ótica (a-d). El oído interno maduro posee tres tipos de epitelios sensoriales (e-g). Abreviaturas: T, tubo neural; N, notocorda; G, ganglio estatoacústico; AA, ampolla anterior; AL, ampolla lateral; AP, ampolla posterior; S, sáculo; U, utrículo; C, cóclea; CUP, cúpula; MO, membrana otoconial; MT, membrana tectoria (adaptado de Bryant y cols. 2002).

y una prominente estructura extracelular (la cúpula de las crestas ampulares, la membrana otoconial de las máculas y la membrana tectoria del órgano de Corti) (Bryant y cols. 2002; Barald y Kelley 2004).

1.3 Estructura de la cóclea adulta

La cóclea humana es un conducto membranoso de unos 3-3.5 cm de longitud que se enrolla sobre sí mismo describiendo dos vueltas y media (una y tres cuartos en ratón) en torno a un eje central llamado modiollo, por donde viaja el nervio coclear, que forma parte del nervio auditivo (ver Figura 3A). Externamente, está protegida por una cubierta ósea llamada cápsula ótica. Su interior está subdividido en tres conductos: la rampa vestibular y la rampa timpánica, rellenas de perilinfa, y el conducto coclear o rampa media, rellena de endolinfa. Ambos fluidos se mantienen separados gracias a un sistema de uniones estrechas (*tight junctions*) entre las células epiteliales que revisten el conducto coclear. La endolinfa presenta una composición iónica poco usual en un fluido extracelular, con una alta concentración de iones K^+ y una baja concentración de Na^+ ; por el contrario, la perilinfa (derivada del fluido cerebroespinal) posee una concentración alta de Na^+ y baja de K^+ . Esta diferente composición iónica crea una diferencia de potencial entre ambos fluidos, de aproximadamente +80 mV, que se denomina potencial endococlear. En la zona basal, la rampa vestibular comunica con la ventana oval, mientras que la rampa timpánica termina en la ventana redonda. Ambas rampas están comunicadas en la parte apical por una apertura llamada helicotrema. La cóclea presenta una organización tonotópica, de forma que la sensibilidad a las distintas frecuencias varía gradualmente desde la base (donde se procesan las frecuencias agudas) al ápex (que responde a las frecuencias graves).

El conducto coclear (Figura 3B) se halla delimitado por la membrana de Reissner (MR), que lo separa de la rampa vestibular, el ligamento espiral (LgE), la estría vascular (EV), la membrana basilar (MB), que linda con la rampa timpánica, y el limbo espiral (LiE). Sobre la membrana basilar descansa el órgano sensorial auditivo propiamente dicho u órgano de Corti, formado por células sensoriales y células de soporte, y sobre éste se sitúa la membrana tectoria (MT).

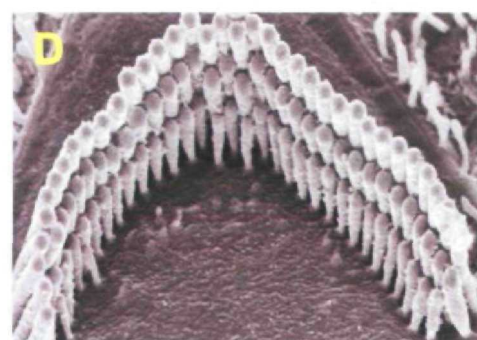
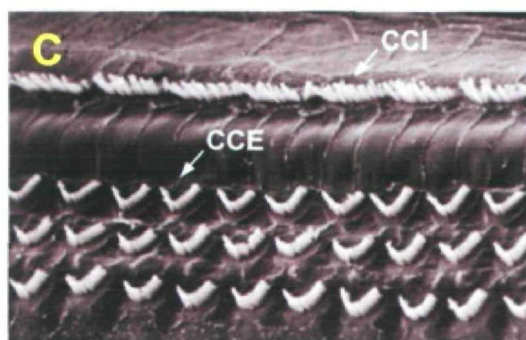
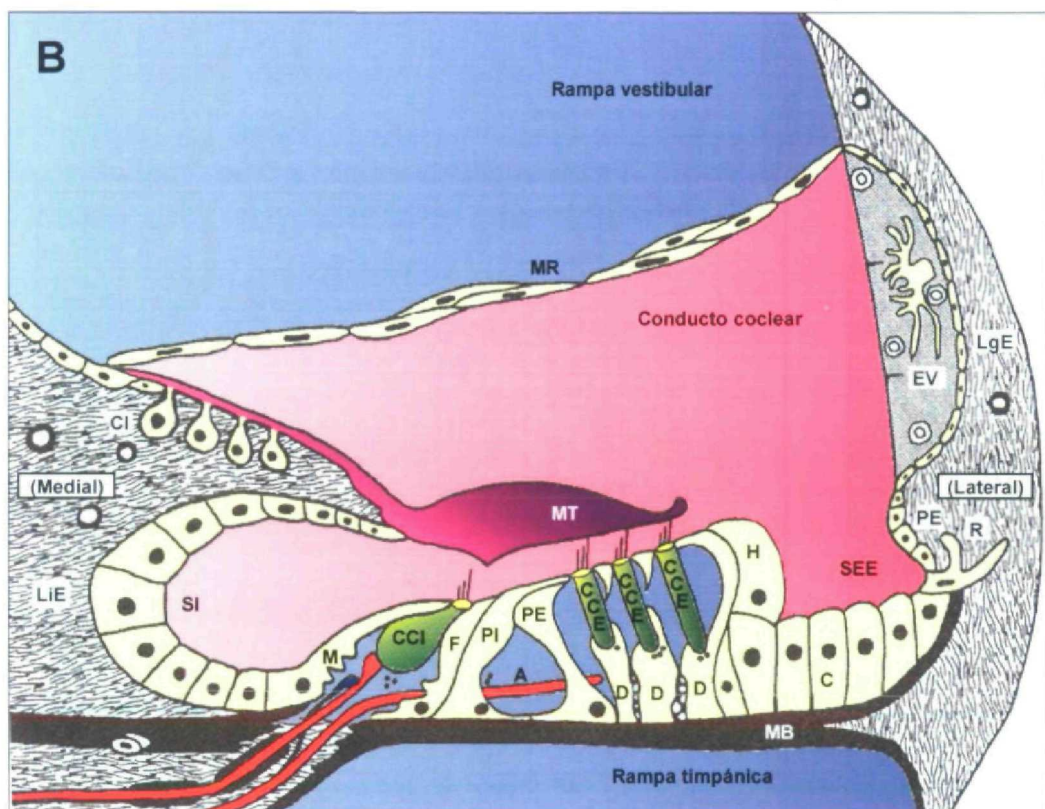
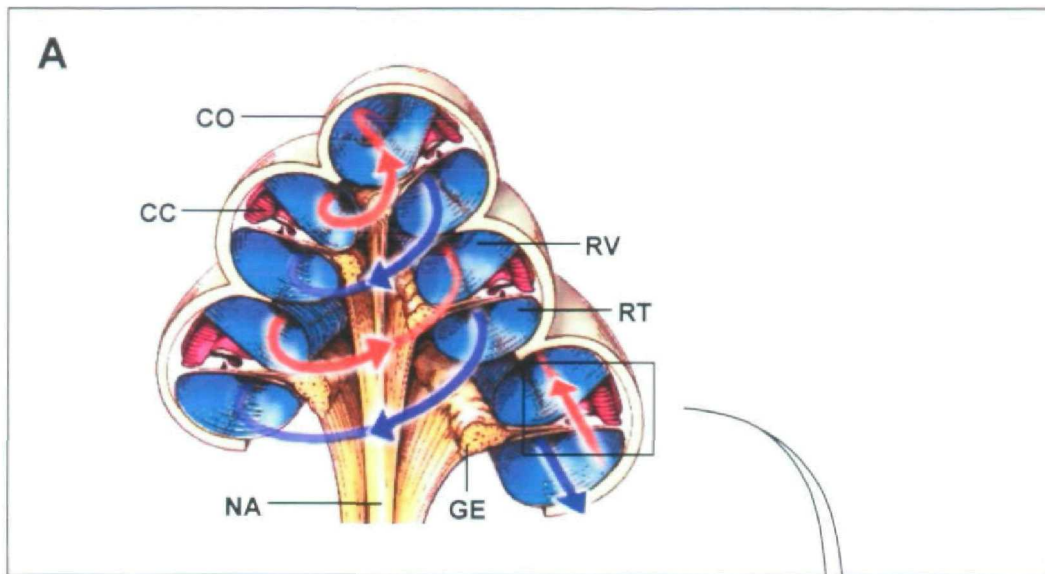
1.3.1 Órgano de Corti

Las células ciliadas son las células sensoriales auditivas; existen dos tipos: las células ciliadas internas (CCIs), que se disponen en una hilera longitudinalmente a lo largo de la cóclea, y las células ciliadas externas (CCEs), que forman tres hileras (Figura 3B y C). La

principal diferencia entre ambos tipos celulares es que las CCIs son las células realmente sensoriales, y por tanto las que transmiten la información al nervio auditivo; las CCEs, en cambio, aunque presentan características sensoriales, también tienen capacidad motil, y son las células responsables de la alta sensibilidad de la cóclea al estímulo auditivo, así como de la exquisita capacidad de resolución de frecuencias. Tanto CCIs como CCEs presentan en su parte apical un penacho de *microvilli* rígidos denominados estereocilios, que están dispuestos linealmente en las CCIs, y en forma de “U” o “W” en las CCEs (Figura 3C). Dicho penacho está formado por tres hileras de estereocilios cuya longitud va creciendo “en escalera” hacia la parte lateral (externa) de la cóclea (Figura 3D). Los estereocilios poseen en su interior un haz denso de filamentos de actina que les permite mantener su rigidez. Las puntas de los estereocilios están conectadas al lateral de los estereocilios (más largos) de la hilera adyacente mediante unas fibrillas llamadas uniones apicales (*tip links*); los estereocilios también se conectan unos con otros dentro de la misma hilera y entre hileras adyacentes por medio de uniones laterales. La longitud de las CCEs, así como la de sus estereocilios, aumenta en gradiente de la base al ápex de la cóclea.

En el órgano de Corti, las células ciliadas están rodeadas por células de soporte altamente diferenciadas, con una función de apoyo, tanto metabólico como estructural. En sentido radial, desde el lado medial hasta el lado lateral (ver Figura 3B), se encuentran las células marginales (M) y las células falángicas internas (F), que rodean a las CCIs, las células pilares internas (PI) y externas (PE), que separan a ambos tipos de células ciliadas, las células de Deiters (D), sobre las que descansan las CCEs, y las células de Hensen (H). Las paredes laterales de las células ciliadas y de soporte están selladas en su parte apical por uniones estrechas, que crean, en el órgano de Corti, una superficie continua llamada lámina reticular,

Figura 3. A) Sección medio-modiolar de la cóclea mostrando los tres compartimentos en que se divide. Abreviaturas: CO, cápsula ótica; CC, conducto coclear; RV, rampa vestibular; RT, rampa timpánica; GE, ganglio espiral; NA, nervio auditivo. La flecha roja procede de la ventana oval; la flecha azul apunta hacia la ventana redonda (adaptado de S Blatrix, CRIC; URL: <http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition/english/start.htm>). En el recuadro se muestra una sección transversal ampliada en **B)**, donde se observa en detalle la separación de la perilinfa (azul) y la endolinfa (rosa). Abreviaturas: MR, membrana de Reissner; EV, estria vascular; LgE, ligamento espiral; PE, prominencia espiral; MB, membrana basilar; LiE, limbo espiral; CCI, célula ciliada interna; CCE, célula ciliada externa; MT, membrana tectoria; CI, células interdenticulares; SI, surco interno; M, célula marginal; F, célula falángica interna; PI, célula pilar interna; PE, célula pilar externa; D, células de Deiters; H, células de Hensen; C, células de Claudius; R, célula raíz; SEE, surco espiral externo; A, terminal aferente. Se indican los lados medial (hacia el modiol) y lateral (en la zona externa) de la cóclea (adaptado de Slepecky 1996). **C)** Superficie de la lámina reticular, donde se pueden ver los estereocilios de las células ciliadas internas (CCI) y de las células ciliadas externas (CCE) (fotografía de M Lenoir, CRIC; URL: <http://www.cochlea.org>). **D)** Ampliación del penacho de estereocilios de una célula ciliada externa, donde se pueden observar las tres hileras de estereocilios, dispuestas en “W” (Friedman y cols. 2000).



la cual actúa de barrera entre la endolinfa y la perilinfa impidiendo el paso de iones a través de los amplios espacios intercelulares. Las células pilares y las células de Deiters son especialmente importantes para soportar el estrés mecánico que sufre el órgano de Corti tras la estimulación auditiva, y por ello presentan bases celulares anchas que se apoyan en la membrana basilar (MB) y un importante citoesqueleto basado en haces de microfilamentos y microtúbulos que se extienden a lo largo de toda su longitud.

Las células ciliadas del órgano de Corti presentan innervación tanto aferente (hacia el cerebro) como eferente (desde el cerebro). El nervio coclear está formado por las fibras aferentes, cuyas neuronas presentan sus somas en el ganglio espiral, situado en el modíolo. Estas neuronas emiten dendritas que hacen sinapsis en la base de las células ciliadas: la gran mayoría (el 95% de la población del ganglio espiral) son células ganglionares tipo I, que contactan con las CCIs, mientras que el 5% restante son células ganglionares tipo II, que contactan con las CCEs. Ambos tipos de células ciliadas reciben innervación eferente, con una posible función de modulación postsináptica y/o de protección frente a la sobreestimulación.

1.3.2 Membrana basilar

La membrana basilar (MB) (Figura 3B) es una capa compuesta principalmente por matriz extracelular, sobre la cual se asienta el órgano de Corti. Está formada por filamentos paralelos orientados en sentido transversal, incluidos en una matriz amorfa, y posee la capacidad de vibrar en respuesta al estímulo sonoro. La MB presenta dos partes bien diferenciadas: la zona arqueada (parte medial), que está incluida en la lámina espiral ósea y por tanto no tiene la capacidad de vibrar, y la zona pectínea (parte lateral), que puede vibrar libremente. Las células ciliadas internas se localizan sobre la zona arqueada, mientras que las células ciliadas externas se sitúan por encima de la zona pectínea. De base a ápex de la cóclea, la MB exhibe un gradiente estructural en el cual disminuye su rigidez y aumenta su masa. La MB juega un papel importante en la alta selectividad (discriminación de frecuencias) de la cóclea.

1.3.3 Membrana tectoria

La membrana tectoria (MT) (Figura 3B) es una estructura gelatinosa compuesta por matriz extracelular, que se encuentra suspendida sobre el órgano de Corti. En su zona medial, se ancla al limbo espiral a través de las células interdentes (CI), que secretan el material que la compone; en la parte lateral, hace contacto con los estereocilios más largos de las células

ciliadas externas (éstos se hallan implantados en la superficie inferior de la MT) y con las células de Hensen. La MT presenta una estructura muy organizada, con haces radiales de fibras colagenosas embebidos en una matriz de fibrillas entrecruzadas formadas por proteínas no colagenosas (principalmente α y β -tectorina); la distinta distribución de ambos tipos de fibras define regiones dentro de la MT con diferentes propiedades. Al igual que la MB, la MT exhibe un gradiente en el que la masa aumenta de la base al ápex de la cóclea.

1.3.4 Estría vascular

Se trata de un tejido muy vascularizado en la pared lateral del conducto coclear (Figura 3B), y es responsable de la secreción de K^+ a la endolinfa y por tanto del mantenimiento del potencial endococlear. Está formada por tres tipos celulares: células marginales, intermedias y basales (del lado medial al lado lateral). Las células marginales, derivadas del laberinto membranoso, forman una capa celular en contacto con la endolinfa e intervienen en el transporte activo de iones K^+ al espacio endolinfático. Las células intermedias son melanocitos derivados de la cresta neural; estas células forman una capa discontinua situada entre las otras dos capas celulares. Las células basales son células planas de origen mesenquimático que forman una capa continua, estableciendo una barrera entre la estría vascular y el ligamento espiral. Al igual que las células marginales, presentan un importante sistema de uniones estrechas que crea un compartimento cerrado dentro de la estría, separando la endolinfa y la perilinfa (para mayor detalle sobre la estructura de la cóclea, ver Slepecky 1996; Forge y Wright 2002; Raphael y Altschuler 2003).

1.4 Fisiología de la audición

El oído interno es una estructura de una extraordinaria complejidad y precisión, que se podría calificar como una de las más notables muestras de microingeniería del organismo de los vertebrados. Aunque nuestros conocimientos actuales sobre la fisiología de la audición distan mucho de ser completos, se expone a continuación un breve resumen de la cascada de acontecimientos que tiene lugar desde la captación de la onda sonora hasta su codificación en forma de impulsos nerviosos.

Las ondas sonoras capturadas por el pabellón auricular son canalizadas a través del conducto auditivo externo hasta la membrana timpánica, donde la vibración se transmite por medio de la cadena de huesecillos a la membrana que recubre la ventana oval del laberinto óseo. La vibración de ésta genera ondas de presión en la perilinfa de la rampa vestibular, que a su vez hacen vibrar por resonancia a la membrana basilar en un punto dado, dependiendo de

su frecuencia. El desplazamiento de la membrana basilar genera un acercamiento entre la superficie de las células ciliadas externas (CCEs) y la membrana tectoria, lo cual a su vez provoca una desviación al unísono del penacho de estereocilios. La tensión generada en las uniones apicales (*tip links*) genera la apertura de los canales catiónicos de transducción, localizados en la punta de cada estereocilio (formados probablemente por TRPA1; Corey y cols. 2004). Se piensa que estos canales están mecánicamente acoplados a las uniones apicales, ya que una desviación de tan sólo unos pocos nanómetros en dirección al estereocilio más largo es capaz de abrirlos en cuestión de microsegundos. Debido a la diferencia de potencial entre la endolinfa y el citoplasma de las células ciliadas en reposo (aproximadamente +150 mV), la apertura de estos canales genera un flujo de iones K^+ , a favor de gradiente electroquímico, hacia el interior de las CCEs, y éstas se despolarizan. Esta despolarización, a su vez, provoca una rápida contracción en las CCEs; éste es un mecanismo activo que devuelve la energía mecánica al órgano de Corti, amplificando el movimiento de la membrana basilar (fenómeno conocido como “amplificación” coclear) y provocando la excitación de las células ciliadas internas (CCIs), posiblemente a través de su interacción con la membrana tectoria. La apertura de canales de transducción en las CCIs provoca su despolarización y activa, a su vez, la apertura de canales de Ca^{2+} en su membrana basolateral, lo cual desencadena la fusión de vesículas sinápticas a la membrana plasmática. La liberación de neurotransmisores (glutamato) activa el nervio acústico, que envía la información auditiva al sistema nervioso central.

Las células ciliadas (tanto internas como externas) necesitan ser repolarizadas rápidamente para permitir una rápida sucesión de ciclos de mecanotransducción. A esto contribuye el mecanismo de “adaptación” que existe en los estereocilios, el cual asegura el cierre de los canales de transducción antes de que el estereocilio vuelva a su posición inicial, mediante la relajación de la tensión de las uniones apicales. Este mecanismo, activado por el aumento de Ca^{2+} intracelular que se da cuando los canales de transducción están abiertos (debido a que éstos son también permeables al Ca^{2+}), reduce el tiempo de apertura de dichos canales. Por otra parte, la despolarización de la célula ciliada provoca la apertura de canales de K^+ en su membrana basolateral (formados por KCNQ4) y la salida de iones K^+ al espacio extracelular del órgano de Corti, bañado por perilinfa. El K^+ debe ser reciclado nuevamente a la endolinfa para mantener el potencial endococlear. Esto se consigue por medio de dos redes independientes de uniones comunicantes (*gap junctions*) en la cóclea: el sistema de las células epiteliales y el sistema del tejido conectivo (Figura 4). El primero incluye las células

interdentales, todas las células de soporte cocleares (células del surco interno, células de soporte del órgano de Corti y células de Claudius) y las células raíz (*root cells*) (ver Figura 3B); el segundo sistema incluye, entre otros, los fibrocitos del ligamento espiral y las células basales e intermedias de la estría vascular. El K^+ liberado por las células ciliadas es tomado por las células de soporte y se mueve lateralmente a través del sistema del tejido epitelial hasta la parte inferior del ligamento espiral, donde es secretado al espacio extracelular por las células raíz. Posteriormente, los fibrocitos del ligamento espiral incorporan este K^+ , que circula a través del sistema del tejido conectivo hasta el interior de la estría vascular, donde las células marginales lo secretan de nuevo al espacio endolinfático (para más detalle sobre fisiología de la audición, ver Kikuchi y cols. 2000; Petit y cols. 2001; Gillespie y Walker 2001; Friedman y Griffith 2003; Pujol y cols. 2005).

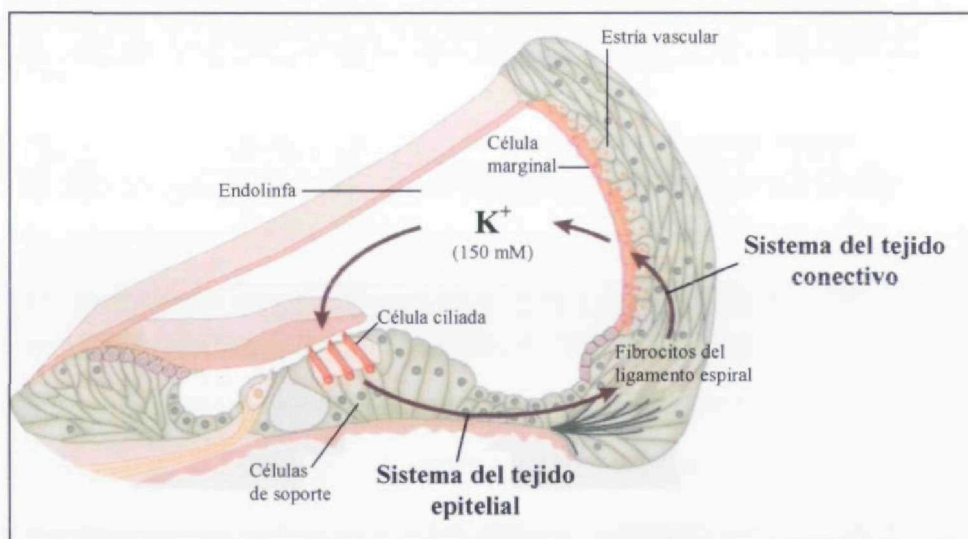


Figura 4. Esquema que muestra el flujo del K^+ dentro de la cóclea: el K^+ de la endolinfa es tomado por las células ciliadas y posteriormente liberado a través de su membrana basolateral. Para ser reciclado, el K^+ atraviesa dos redes de uniones comunicantes, los sistemas del tejido epitelial y del tejido conectivo, hasta llegar a la estría vascular, donde las células marginales lo secretan de nuevo a la endolinfa (adaptado de Jentsch 2000).

En la compleja y delicada maquinaria del oído interno, son muchas las moléculas que participan concertadamente en su funcionamiento; sin embargo, debido a la gran inaccesibilidad de la cóclea dentro del hueso temporal y al escaso número de células de cada tipo dentro de ésta (por ejemplo, sólo 10.000 células ciliadas, en contraste con los 120 millones de fotorreceptores de la retina), las aproximaciones clásicas de bioquímica han sido poco fructíferas para identificar los componentes moleculares de las células cocleares, por lo que nuestro conocimiento sobre la fisiología de este órgano sensorial a nivel molecular ha sido escaso hasta hace pocos años. Actualmente, gracias al avance en el estudio genético de las sorderas, se está comenzando a desentrañar las bases moleculares de la función auditiva.

2 La sordera: aspectos generales

2.1 Epidemiología

La sordera o hipoacusia es el déficit sensorial más frecuente en humanos, afectando a un 6-8% de la población en países desarrollados. Puede aparecer a cualquier edad y con cualquier grado de severidad y compromete seriamente la calidad de vida, especialmente si se presenta en la infancia temprana, ya que impide la correcta adquisición del lenguaje y la integración social del niño afectado. No menos importante es una pérdida de audición que se presenta en la juventud o en la edad adulta, puesto que es mucho más frecuente y suele empeorar con el tiempo, conduciendo al progresivo aislamiento social del individuo (Petit y cols. 2001).

Aproximadamente, 1 de cada 1000 niños está afectado de sordera severa o profunda al nacer o en la infancia temprana, en el periodo prelocutivo (es decir, antes de la adquisición del lenguaje hablado). Se ha estimado que en los países desarrollados al menos un 60% de estos casos tiene origen genético, porcentaje que sin duda irá en aumento a medida que los sistemas sanitarios contribuyan a la disminución de los factores ambientales responsables (infecciones, trauma acústico o craneal y fármacos ototóxicos entre otros) (Morton 1991; Marazita y cols. 1993). La prevalencia de la hipoacusia aumenta significativamente con la edad: se calcula que aproximadamente el 5% de la población por debajo de 45 años y alrededor del 50% de las personas con 80 años de edad tienen un déficit auditivo que afecta a la comunicación normal (Petersen 2002). Aunque no hay estudios documentados sobre la proporción de casos genéticos en las formas postlocutivas, se considera que, en su gran mayoría, estos casos son resultado de la combinación de factores genéticos y ambientales. Entre las formas de aparición tardía, merecen mención especial la otosclerosis y la presbiacusia (pérdida auditiva relacionada con la edad), ya que ambas parecen tener un importante componente genético en su etiología (Kalatzis y Petit 1998; Petersen 2002).

2.2 Clasificación

Las hipoacusias se pueden clasificar en base a sus características clínicas y genéticas. Clínicamente, se definen en función de los siguientes criterios (Willems 2000; Tekin y cols. 2001; Smith, Green y Van Camp 2005; Van Camp y Smith 2006):

- **Asociación:** la hipoacusia puede ser sindrómica, en cuyo caso aparece acompañada de otras anomalías en el oído externo o en otros órganos (por ejemplo, retinitis pigmentosa,

bocio, nefritis, etc.), o no sindrómica, cuando aparece aislada o asociada con anomalías del oído medio y/o interno.

- **Tipo de defecto:** la sordera es conductiva si el defecto está en el oído externo o medio, neurosensorial cuando la lesión tiene lugar en el oído interno, mixta cuando es una combinación de hipoacusia conductiva y neurosensorial, y central cuando tiene su origen en las vías auditivas.
- **Edad de aparición:** se habla de hipoacusias prelocutivas cuando comienzan en la infancia, antes de la adquisición del lenguaje hablado. Dentro de éstas, las formas congénitas son aquellas que están presentes desde el nacimiento. Las hipoacusias postlocutivas son las que aparecen después de la adquisición del lenguaje.
- **Frecuencias afectadas:** pueden ser frecuencias bajas (por debajo de 500 Hz -hercios-), medias (entre 501 y 2000 Hz) y altas (por encima de 2000 Hz).
- **Severidad:** se refiere al grado de pérdida auditiva (tomado como la media para las frecuencias de 0.5, 1, 2 y 4 kHz) en el oído con mejor audición. Así, la sordera se clasifica como leve, cuando hay una pérdida de entre 20 y 40 dB (decibelios); moderada, cuando la pérdida es de 41 a 70 dB; severa, cuando la pérdida es de 71 a 95 dB, y profunda cuando supera los 95 dB.
- **Progresión:** la sordera puede ser progresiva (la pérdida auditiva aumenta con el tiempo), estable (no progresa) o fluctuante. Se considera progresiva cuando existe un deterioro de la audición mayor a 15 dB (como media sobre las frecuencias de 0.5, 1 y 2 kHz) en un periodo de 10 años.
- **Unilateral o bilateral:** dependiendo de si hay afectación de un solo oído o de ambos, respectivamente.
- **Alteraciones vestibulares:** pueden estar o no presentes, acompañando a la sordera, y consisten en trastornos del equilibrio, mareos, vértigos, etc.
- Presencia/ausencia de **acúfenos** (“pitidos” en los oídos).

Por otra parte, las hipoacusias con causa genética (hereditarias) son extremadamente heterogéneas, aunque son esencialmente monogénicas; es decir, causadas por defectos en un solo gen. Las sorderas sindrómicas representan un 30% de las formas hereditarias, frente al 70% de las sorderas no sindrómicas. Estas últimas a su vez se pueden clasificar en base al modo de herencia en autosómicas recesivas (un 70-80% de las sorderas hereditarias),

autosómicas dominantes (10-20%), ligadas al cromosoma X (1-2%) y de herencia materna o mitocondrial (0-20%, según las poblaciones) (Tekin y cols. 2001; Morton 2002). Generalmente, la sordera no sindrómica autosómica recesiva es prelocutiva, casi siempre congénita, neurosensorial, severa o profunda, estable y con afectación de todas las frecuencias. La sordera no sindrómica autosómica dominante, en cambio, suele ser postlocutiva, neurosensorial, menos severa en su comienzo, progresiva y con alteración de un rango particular de frecuencias (Petit 1996; Bom y cols. 1999). Es en este último tipo de sordera en el que se centra este trabajo.

3 Genética de las hipoacusias hereditarias

El mapeo e identificación de genes responsables de hipoacusia comenzó a principios de la década de los 90, con el estudio de las sorderas sindrómicas. Las formas sindrómicas son más fáciles de estudiar puesto que los pacientes pueden agruparse en clases homogéneas en base a los signos clínicos que acompañan a la sordera, lo que facilita el análisis de ligamiento genético. Aunque se han descrito más de 400 síndromes con sordera (Gorlin y cols. 1995, OMIM 2005), éstos representan una minoría entre las sorderas hereditarias. El mapeo de genes responsables de sorderas no sindrómicas por estudios de ligamiento genético es, en cambio, una tarea ardua debido a la gran heterogeneidad genética de este defecto, a la ausencia de criterios clínicos distintivos que permitan diferenciar los daños causados por las distintas mutaciones, y a la relativamente elevada frecuencia de uniones entre sordos, lo que a menudo introduce defectos en distintos genes en una misma familia. Sin embargo, ha sido posible mapear un número considerable de genes gracias al análisis de ligamiento en familias grandes, con numerosos individuos afectados. Si bien antes de 1994 sólo se conocían tres *loci* de sorderas no sindrómicas, con un único gen identificado, el rRNA 12S mitocondrial, en la última década el número de *loci* de sorderas no sindrómicas ha crecido vertiginosamente. Actualmente hay descritos 95 (ver Figura 5); de éstos, 41 corresponden a hipoacusias dominantes (designados como DFNA más el número correspondiente al orden de descubrimiento), 48 a hipoacusias recesivas (DFNB), 4 a sorderas ligadas al sexo (DFN) y 2 a sorderas mitocondriales. Además, se ha descrito un *locus* modificador (DFNM1), capaz de prevenir la sordera asociada a DFNB26. En relación a estos *loci*, se ha identificado un total de 38 genes responsables de hipoacusia, que codifican productos de funciones muy diversas (Figura 5 y Tabla 1; para revisión, ver Petit y cols. 2001; Friedman y Griffith 2003; para

información actualizada sobre sorderas no sindrómicas, ver Van Camp y Smith 2006).

Cabe mencionar dos particularidades en relación a la heterogeneidad genética y clínica de las sorderas: 1) existen *loci* que albergan más de un gen de sordera en su intervalo crítico (DFNA3/B1 y DFNA2, por ejemplo, son digénicos, y se postula que DFNA2 podría contener un tercer gen de sordera); 2) así como mutaciones en múltiples genes pueden dar lugar a las mismas manifestaciones clínicas, también distintas mutaciones en un mismo gen pueden resultar en fenotipos completamente distintos. Así, existen genes que pueden dar lugar a sorderas dominantes y recesivas, y también hay genes que pueden provocar sorderas sindrómicas y no sindrómicas (Figura 5). Un buen ejemplo de ello es el gen *MYO7A*, cuyas mutaciones pueden dar lugar a una sordera moderada, postlocutiva y progresiva con herencia dominante (DFNA11), a una sordera profunda congénita de herencia recesiva (DFNB2) o al síndrome de Usher tipo 1b, de herencia también recesiva, que se caracteriza por una sordera profunda congénita, alteraciones vestibulares y retinitis pigmentosa.

Los espectaculares avances en el campo de la genética de las sorderas han sido facilitados en gran medida por la disponibilidad de la secuencia del genoma humano, la identificación y mapeo de ESTs específicos de cóclea, y el empleo del ratón como modelo animal para el estudio de los trastornos del oído interno, debido a la alta similitud de su estructura coclear con la humana. Hay que mencionar que, en paralelo a la identificación de genes humanos responsables de hipoacusia, se ha hecho un rápido progreso en el descubrimiento de genes de sordera en ratón; hoy en día se conocen cerca de 200 genes que pueden afectar al desarrollo y funcionamiento del oído interno en esta especie (HHIM 2005). Teniendo en cuenta el elevado número de *loci* de sorderas (tanto sindrómicas como no sindrómicas) mapeados en humanos, muchos de los cuales aún no tienen gen conocido, y el escaso solapamiento que existe entre genes de sordera descritos en ambas especies, cabe esperar que en los próximos años se descubran muchos más genes responsables de sordera en el hombre. No sería sorprendente que hasta un 1% del total de genes humanos, es decir, aproximadamente 300, fueran necesarios para la audición (Friedman y Griffith 2003), lo que hace evidente la extraordinaria complejidad del oído interno.

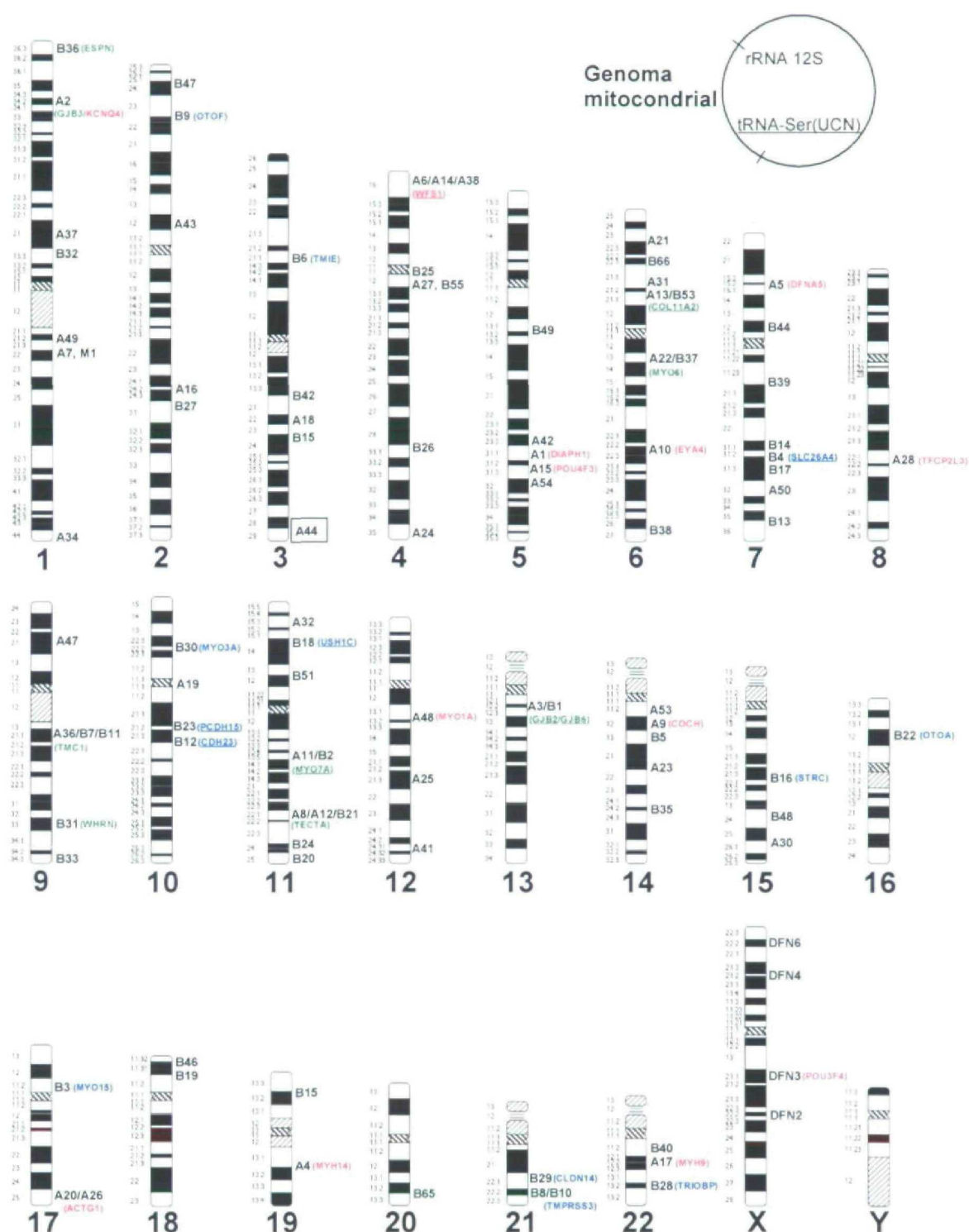


Figura 5. Mapa que representa todos los *loci* de sordera no sindrómica descritos, en los distintos cromosomas humanos y en el genoma mitocondrial. A, *loci* dominantes; B, *loci* recesivos; DFN, *loci* ligados al cromosoma X; M1, *locus* modificador DFNM1. Entre paréntesis se muestra el gen responsable correspondiente, en los casos en que está descrito (en rojo, los que presentan mutaciones dominantes; en azul, los que presentan mutaciones recesivas; en verde, aquellos genes en que se han encontrado mutaciones tanto dominantes como recesivas; en rosa, el gen ligado al X; subrayados, los genes que son también responsables de sorderas sindrómicas). En un recuadro se muestra el locus descrito en este trabajo.

Tabla 1. Genes responsables de hipoacusias no sindrómicas.

Función celular	Gen	Proteína	Papel en el oído interno
Adhesión celular	<i>CDH23</i>	cadherina 23	Formación del penacho de estereocilios
	<i>PCDH15</i>	protocadherina 15	
Canal de potasio	<i>KCNQ4</i>	KCNQ4	Reciclaje de iones K ⁺
Transportadores aniónicos	<i>SLC26A4</i>	pendrina	Homeostasis de la endolinfa
	<i>SLC26A5*</i>	prestina	Electromotilidad en las CCEs
Uniones intercelulares comunicantes (<i>gap junctions</i>)	<i>GJB2</i>	conexina 26	Reciclaje de iones K ⁺
	<i>GJB6</i>	conexina 30	
	<i>GJB3</i>	conexina 31	
Uniones intercelulares estrechas (<i>tight junctions</i>)	<i>CLDN14</i>	claudina 14	Delimitación de endolinfa y perilinfa
Enzimas	<i>TMPRSS3</i>	TMPRSS3	Homeostasis de la endolinfa
Sinapsis	<i>OTOF</i>	otoferlina	Fusión de vesículas sinápticas en CCI
Proteínas de citoesqueleto	<i>MYO7A</i>	miosina VIIA	Proteínas motoras en el penacho de estereocilios
	<i>MYO15A</i>	miosina XVA	
	<i>MYH9</i>	miosina IIA	
	<i>MYO6</i>	miosina VI	
	<i>MYO3A</i>	miosina IIIA	
	<i>MYO1A</i>	miosina IA	
	<i>MYH14</i>	miosina IIC	
	<i>USH1C</i>	harmonina	Organizadores macromoleculares en el penacho de estereocilios
	<i>WHRN</i>	whirlina	
	<i>ACTG1</i>	γ-actina	Proteína estructural en las células ciliadas
	<i>DIAPH1</i>	diaphanous-1	Proteínas de unión a actina en las células ciliadas
	<i>ESPN</i>	espina	
	<i>TRIOBP</i>	TRIOBP	
Proteínas de matriz extracelular	<i>TECTA</i>	α-tectorina	Componentes estructurales de la membrana tectoria
	<i>COL11A2</i>	colágeno XI, α2	
	<i>COCH</i>	coclina	N.D.
	<i>OTOA</i>	otoancorina	Anclaje entre la membrana tectoria y el epitelio sensorial
Reguladores transcripcionales	<i>POU3F4</i>	POU3F4	Desarrollo del sistema auditivo
	<i>POU4F3</i>	POU4F3	
	<i>EYA4</i>	EYA4	
	<i>TFCP2L3</i>	TFCP2L3	
Regulador de hormonas tiroideas	<i>CRYM*</i>	μ-cristalina	
Traducción	<i>MTRNR1</i>	rRNA 12S	Síntesis mitocondrial de proteínas
	<i>MTTS1</i>	tRNA-Ser(UCN)	
Función desconocida	<i>DFNA5</i>	DFNA5	N.D.
	<i>STRC</i>	estereocilina	
	<i>WFS1</i>	wolframina	
	<i>TMC1</i>	proteínas transmembrana	
	<i>TMIE</i>		

* Sin locus descrito.

N.D.: no determinado.

OBJETIVOS

En el año 2000 se remitió a nuestro laboratorio un caso familiar de sordera neurosensorial, no sindrómica, que se heredaba de forma autosómica dominante. Tanto el patrón de herencia como los datos clínicos de los pacientes sugerían que la causa de la sordera era monogénica. La estructura de la familia, así como el número suficiente de individuos sanos y afectados, indicaban que el caso era apto para el análisis de ligamiento genético. Por consiguiente, planteamos el trabajo aquí descrito con los siguientes objetivos:

1. Mapear el *locus* de sordera en la familia, y definir el mínimo intervalo genético que contuviera el gen responsable.
2. Identificar el gen implicado en la sordera, determinando la mutación causante de patología.
3. Investigar la función de dicho gen en el sistema auditivo, comenzando por la caracterización de la expresión espacio-temporal del ortólogo de ratón en el oído interno.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Estudio de la familia S281

1.1 Datos familiares y clínicos

La familia S281 (Figura 7 en pág. 69) fue remitida a nuestro laboratorio a través del Hospital Universitario “Puerta del Mar”, Cádiz, en base a un historial de hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica dominante (HNNSAD). De los 40 individuos de la familia, 27 participaron en el estudio, de los cuales 14 estaban afectados y 13 eran normoyentes. De todos ellos se obtuvo un consentimiento informado. El análisis detallado de la historia clínica y posterior examen físico de los pacientes, permitió descartar los factores ambientales como causa de la sordera y confirmó la ausencia de anomalías sindrómicas. Se descartó asimismo una hipoacusia conductiva mediante examen otoscópico y acumetría. Se realizaron audiometrías tonales liminares para medir la conducción por vía aérea (125-8000 Hz) y por vía ósea (250-4000 Hz), y se recogieron los audiogramas previos disponibles de los pacientes. Se hizo un análisis de tomografía axial computerizada (TAC) del oído del paciente III:1. Finalmente, de los individuos participantes se extrajo sangre periférica, de la cual se obtuvo el DNA por el método salino (Miller y cols. 1988).

1.2 Genotipado

Para la exclusión de todos los *loci* DFNA conocidos y para el refinamiento del nuevo intervalo DFNA44, se utilizaron marcadores microsatélite tomados de los mapas genéticos humanos Génethon (Dib y cols. 1996) y Marshfield (*Center for Medical Genetics*) y del mapa físico de STSs del NCBI. El orden de los marcadores fue asignado mediante la integración de los mapas genéticos y físico. Los 394 marcadores empleados en el análisis a genoma completo fueron tomados del panel de microsatélites ABI Prism Linkage Mapping Set 2 (Applied Biosystems).

Los marcadores se amplificaron en cada individuo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos marcados fluorescentemente en 5' (uno de cada pareja) con TET, FAM o HEX (Roche). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 15 µl en un aparato Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600, utilizando 20-40 ng de DNA genómico, 10 pmoles de cada oligo, 2.5 nmoles de cada dNTP, 0.75 U de polimerasa *FastStart Taq* (Roche), y tampón de reacción 1X con una concentración final de MgCl₂ de 1.5 mM, empleando el siguiente programa: 1) un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 2) 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, seguido de

anillamiento-elongación a 56°C durante 40 segundos, y 3) un ciclo final de elongación a 72°C durante 5 minutos.

El genotipado se llevó a cabo en los siguientes pasos: 1) se mezclaron, para un mismo individuo, varios marcadores no solapantes en tamaño o color con una dilución de 1:15 para cada producto de PCR marcado con TET, 2:15 para los marcados con FAM y 3:15 para los marcados con HEX; 2) en un tubo especial para genotipado (Applied Biosystems) se añadieron, a 1.5 µl de la mezcla anterior, 0.5 µl del marcador de peso molecular TAMRA (Applied Biosystems) y 12 µl de formamida; 3) se desnaturalizó a 96°C durante 5 minutos, y 4) se realizó una electroforesis capilar en un analizador automático de DNA ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems) según las indicaciones del fabricante, y se obtuvo el tamaño de los alelos mediante un análisis con el programa GeneScan (Applied Biosystems).

1.3 Análisis de ligamiento

Una vez hallado el genotipo de todos los individuos de la familia para cada uno de los marcadores, se realizó un análisis de ligamiento a dos puntos para determinar si el *locus* de sordera estaba genéticamente ligado a alguno de dichos marcadores, y así mapear el gen responsable. Para entender el concepto de ligamiento genético, es preciso hablar sobre la fracción de recombinación (θ). Ésta se define como la probabilidad, durante una meiosis, de que ocurra una recombinación entre dos *loci* dados, y es por tanto una medida de la distancia genética entre esos *loci*: cuanto más alejados se encuentren en un cromosoma, mayor será la fracción de recombinación entre ellos. Así, por ejemplo, una fracción de recombinación de 0.01 entre dos localizaciones genéticas indica que en una de cada 100 meiosis (1%) se ha dado una recombinación, lo cual se define como 1 centiMorgan (cM), que es la unidad de distancia genética. El valor máximo de θ es 0.5, ya que si dos *loci* se encuentran lo suficientemente alejados el uno del otro, o en distintos cromosomas, la probabilidad de que se hereden juntos es azarosa, y por tanto del 50%.

En familias grandes, el análisis de ligamiento se lleva a cabo mediante algoritmos matemáticos que calculan la probabilidad de ligamiento en función de la fracción de recombinación, para un genotipo dado. El resultado se muestra en forma de *lod score* (Z), que de forma resumida se podría definir como:

$$Z = \log_{10} \frac{\text{probabilidad de ligamiento } (\theta)}{\text{probabilidad de no ligamiento}}$$

En general, se acepta que existe ligamiento cuando $Z \geq 3$ (con un 5% de posibilidad de error), lo cual indica una probabilidad de ligamiento frente a no ligamiento de 1000:1, y se descarta el ligamiento (se excluye) cuando $Z \leq -2$. El rango de Z comprendido entre -2 y +3 es de incertidumbre, lo cual quiere decir que los datos son insuficientes para concluir un ligamiento o una exclusión fiables. Si entre el *locus* de enfermedad y un marcador determinado no hay recombinaciones, el valor de *lod score* máximo (Z_{\max}) se alcanza a $\theta=0$; si hay recombinaciones, Z_{\max} se alcanza para la fracción de recombinación más probable, según la distancia entre ellos (para profundizar sobre conceptos de ligamiento, ver Terwilliger y Ott 1994; Strachan y Read 1999).

El análisis de ligamiento en la familia S281 se llevó a cabo mediante el paquete informático LINKAGE 5.1 (Lathrop y cols. 1985), utilizando el programa MLINK para determinar los valores de *lod score* (Z) en función de la fracción de recombinación (θ), y el programa ILINK para hallar los valores de Z_{\max} (*lod score* máximo) y θ_{\max} (fracción de recombinación para Z_{\max}). Se calcularon *lod scores* a 2 puntos entre el *locus* de sordera y cada uno de los marcadores, definiendo un modo de herencia autosómico dominante con penetrancia completa. Se tomó como frecuencia del alelo de enfermedad 0.00001 y se consideraron iguales todas las frecuencias alélicas para cada marcador.

1.4 Análisis de genes candidatos

1.4.1 Amplificación por PCR

Se diseñaron oligonucleótidos con ayuda del programa informático OLIGO 4.0 para la amplificación de todos los exones (incluyendo las uniones exón-intrón) de los genes candidatos (ver Tabla 2). La PCR se llevó a cabo con el siguiente programa: 1) un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 2) 5 ciclos de: desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, anillamiento a $(T_a+5)^\circ\text{C}$ durante 15 segundos para el primer ciclo, con reducción de la temperatura de 1°C/ciclo (*touchdown*), y elongación a 72°C durante 30 segundos, 3) 30 ciclos de: desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, anillamiento a $(T_a)^\circ\text{C}$ durante 15 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos, y 4) elongación final a 72°C durante 5 minutos. El tamaño de los amplificados se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio, visualizándose las bandas a la luz ultravioleta.

1.4.2 Anál isis de heterodúplex

Para la búsqueda de mutaciones en los genes candidatos se llevó a cabo un análisis de heterodúplex con los productos de amplificación de los distintos exones. Este método permite la detección de cambios puntuales, así como de microdelecciones/inserciones, a nivel del DNA en individuos heterocigotos, y se basa en la formación de los dos tipos distintos de homodúplex y de heterodúplex por desnaturalización del producto de PCR y posterior renaturalización. Los productos resultantes se pueden separar en función de su tamaño y conformación por su diferente velocidad de migración en geles especiales de poliacrilamida (en general, los heterodúplex migran más despacio que los homodúplex). El protocolo es el siguiente: para la preparación de las muestras, 1) se toman 3-10 µl del producto de PCR (según su concentración), se cubren con aceite mineral para evitar la evaporación, y se desnaturalizan a 96°C durante 5 minutos en un vaso de precipitados con 400 ml de agua en ebullición, 2) se dejan enfriar las muestras dentro del vaso de precipitados (a temperatura ambiente) hasta que el agua alcanza una temperatura de 37° C; luego, se mantienen en hielo, y 3) se mezclan las muestras con tampón de carga preparado con sacarosa, xilencianol y azul de bromofenol. Para preparar el gel, 1) se mezclan 20 ml de MDE™ *Gel Solution* (BioWhittaker), 4.8 ml de TBE 5X y 6 g de urea, y se enrasa a 40 ml con agua desionizada, 2) se añaden, a 35 ml de la mezcla, 16 µl de TEMED y 160 µl de APS al 10%, y se decanta entre los cristales (18 x 24 cm); se coloca el peine y se deja polimerizar durante 1 hora, 3) se quita el peine, se lavan los pocillos con tampón TBE 0.6X y se cargan las muestras, y 4) se corre el gel a 250 voltios en TBE 0.6X hasta que el segundo frente de colorante (azul de bromofenol), que migra a la altura de aproximadamente 160 bases, quede a una distancia apropiada del final del gel (unas 17 horas). Se tiñe el gel en bromuro de etidio para visualizar las bandas.

1.4.3 Secuenciación directa

Los productos de PCR se purificaron mediante el *kit* de purificación de PCR *QIAquick* de QIAGEN, y posteriormente se secuenciaron empleando *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, o bien *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) en un analizador automático de DNA ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis de las secuencias se realizó mediante el programa informático *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems).

CLDN16

Exón	Oligonucleótido directo (secuencia 5'→3')	Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)	Polimerasa	MgCl ₂ (mM)	Ta (°C)
1 (I)	TGCACTGACCTGCCCTTCTGAT	TAAAGTGGCGGGTGTCTAGTCTT	197	T	1.0	64
1 (II)	TGCAGCAGGGCGTGAGAA	GCAGTTGGGACTTAGCGAAAAT	322	FS	1.0	64
2	GCTATCAAACACAACCACT	CATTACAACTGGACCGAACCTTA	322	T	1.0	64
3	CCGGAGGGGTGTGTTAATGTT	CCTGTTGCTAGTCCAGCCAGA	305	T	1.0	64
4	GCCATTTTGTGTAGTAAGCAGGTA	AAAACGATAGTGGAGGCAAGG	325	T	1.0	64
5	TCTATATTCTGTTCCTTTTGAGG	AATTCTAAATACTGTTCCTGGATT	333	FS	1.5	60

FGF12

Exón	Oligonucleótido directo (secuencia 5'→3')	Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)	Polimerasa	MgCl ₂ (mM)	Ta (°C)
1a (I)	CTGCCAGACTTTGACTAACCTTG	CTGCAGAAGCGCACTTTGCT	349	T	1.5	64
1a (II)	GCGATAGCCAGCTCCTTGA	GGGGTCAGAAATGTAAAAGAGGAAT	307	T	1.5	64
1b	AAGTACGGGCGAAATCATCAGAT	CCCAGTGCTGCAATGGACAT	267	T	1.0	64
2	GAAACACCCAACTCCCAAATACA	AGGCAGCTTAGCAATGCTTTAAGT	339	T	2.0	64
3	CTGATCCTTTCCGCCCTTCT	TCAACTTCCAATTTTCTTGCCTAA	236	T	1.5	64
4	TTCTTAACAGAGGACATGGATTTC	CACACAGATAAGGGTCCAACAAAG	347	FS	2.0	60
5	GAGCTTGTGATGAGAGTGAAGAATA	GAAGGGGAAGGGATGAGAGA	268	T	1.5	64

IL1RAP

Exón	Oligonucleótido directo (secuencia 5'→3')	Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)	Polimerasa	MgCl ₂ (mM)	Ta (°C)
1	GTGGAGCCTGAGCCGTGAG	GAGATTCTGCGGCTTGGTGA	277	T	1.0	63
2	CCACATTTTTTACAGAAGCACAACA	AGCTAAAGTTTTTGCTTGGTTTTGT	280	FS	1.0	63
3	CTATAGTCAGCAGGCATGAATGCT	TGCTACCGCAGAAGACAATGG	282	FS	1.0	63
4 (I)	GACCGGGTGAAGTGAAGAGAA	CCGGAACACAGCACATCTT	334	T	1.0	63
4 (II)	CAGCTGGCCTTACTCTGATCTG	AGCTGCAGACAATTACCTCACTAAA	299	T	1.0	63
5 (I)	TTGAATGTGGTTGCTCTATGAAATC	TTGACACTGGAAGGAAAATATCCA	232	FS	1.0	63
5 (II)	TTCAATTCCCCCATGAAACTCC	ACGTGCTGAAATACTTCCATAAAGC	274	T	1.0	63
6	TGTGAGTGTGCGTGTGTTGTAT	TGATCATATGCTTGTGTGTGTA	287	T	1.5	63
7	GGCCTTCTCTAAAACAAGTACAA	GGGAAGTAACTGATCTCCACAGC	359	FS	1.0	63
8	TGATTAGCCAGAGAGTAGAACCAA	AGATCATTAAGTTGAGAAACAAAGG	323	T	2.0	63
9	GGGTCTGTGGTTGCTTACTTG	GGAGCTCTCTTGTCTCAATCTCT	333	FS	1.0	63
10	GGTCACCACACAGAAATCAAT	TCTGCTTAAATCTTCCAGTTAATC	320	FS	1.0	60
11	TGCAAGTAGAAAATCGCACTGG	TGCAAACTAATGATTCTGTCTGC	341	T	1.5	63
12 (I)	AAAAATGTTTACCTCAATTCTTAG	CCATTTAATGACCGTGAGCA	354	FS	1.0	60
12 (II)	AAAGCTGTGAAGGAAACGAAG	CACCCTAAATTTATCCCTATTGG	339	FS	1.0	60

C3orf6

Exón	Oligonucleótido directo (secuencia 5'→3')	Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)	Polimerasa	MgCl ₂ (mM)	Ta (°C)
1	CGGGCTCCGATATTTGGTA	ACGCCCTGACCTGAGAGAA	398	FS	1.0	65
2	TTACTAATGAGCCTTCTGTCTGTT	CCAGCCTCAAGCTACCACTAAA	170	FS	1.5	60
3	GCAAAGCTGTTGTTATGGTAAAGC	AGCTCCACAGAGAAAACAGTCTT	282	FS	1.0	65
4	CAGCCTCTTGCATCTTTATCTTG	AGCTGAGCACCCCTTTCTCC	290	T	2.0	63
5	CAAACCTGGCAGTGAATGTCA	CAGTGCCTGGGGATAAGAGAAA	328	T	1.0	63
6	TCTGCATTTTATTTTTCACATCC	TACATGATACCAGGACTTCCATCG	608	FS	2.0	63
7	TGCACCCACACTGTATTCTG	TTGTCATGATTTTCCACTCATAAA	395	T	2.0	63
8 y 9	AAAAATGCACAACATAGATTCCAA	TATTTGCAGAGCTTAACTCAAAAG	390	T	1.5	63
10	CTTAATCTTTCCCTTTGTTGATGA	TGCAGATTTTGGATCTCCTCTC	274	T	1.5	63
11	AGCGTTACTTAGAATGCCCTTTA	TTTCCACTACAACACGAGGCTTA	220	FS	1.0	63
12	GTTATTTTACTTGGGCAGGGA	TCATGAATAACAAAACATTGAA	283	FS	2.0	60

Tabla 2. Oligonucleótidos y condiciones empleadas en la amplificación de los exones de los genes candidatos, incluyendo el tamaño del amplificado, la polimerasa utilizada (T, *Taq DNA Polymerase*; FS, *FastStart Taq DNA Polymerase*), la concentración final de MgCl₂ y la temperatura de anillamiento (Ta). Los números romanos entre paréntesis indican que los exones correspondientes se han dividido en varios fragmentos solapantes. Los exones 1a y 1b de *FGF12* son alternativos.

1.4.4 Clonaje de la mutación c.1394_1401dup

Se amplificó por PCR el exón 11 de *C3orf6* del individuo III:1 con la polimerasa *Expand High Fidelity* (Roche). El amplificado se purificó utilizando el *kit* de purificación de PCR *QIAquick* de QIAGEN; se eliminaron los nucleótidos protuberantes con la enzima T4 DNA polimerasa (Boehringer Mannheim) y se purificó por fenol-cloroformo-isoamílico, precipitando con 0.1 volúmenes de NaCl 1 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, y resuspendiendo en agua. Este purificado, que constituía el inserto (con extremos romos), se ligó al vector pUC19 (New England BioLabs) cortado con la enzima de restricción *SmaI* (New England BioLabs), que genera extremos romos. Tras inactivación de la enzima *SmaI* a 65°C durante 20 minutos, se realizó la ligación en un volumen final de 10 µl, empleando 2.5 U de T4 DNA ligasa (Roche) y una relación molar 5:1 de inserto a vector, a 23°C durante toda la noche. Para la transformación se emplearon células competentes de la estirpe de *E. coli* XL1-Blue, preparadas según el método de Hanahan (Sambrook y Russell 2001). La transformación se realizó con 5 µl de la ligación y 100 µl de células competentes, siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001), y se plaqueó en placas de agar con ampicilina, X-gal e IPTG, incubando a 37°C toda la noche. Las colonias blancas se reestriaron dos veces para su correcto aislamiento. Para determinar qué colonias contenían el inserto, se realizó una PCR de cada una de ellas empleando los oligonucleótidos universales pUC -47 y pUC -48, que rodean el *polylinker* de pUC19. El molde se preparó resuspendiendo una pequeña muestra de cada colonia en 20 µl de agua, calentando a 96°C durante 5 minutos y centrifugando 1 minuto a máxima velocidad. Como molde, se tomaron 3 µl del sobrenadante, siendo el volumen total de la PCR de 15 µl. Para las colonias sin inserto se obtenía un amplificado de 150 pb, mientras que aquéllas que habían integrado el inserto daban un producto de PCR de 370-378 pb. Para comprobar la secuencia del exón 11 clonado, se cultivaron las colonias con inserto en medio con ampicilina y se purificaron los correspondientes plásmidos utilizando el *kit QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), que se secuenciaron empleando los oligonucleótidos pUC -47 ó pUC -48 según el procedimiento que se describe en el apartado 1.4.3.

1.4.5 Test diagnóstico para la mutación c.1394_1401dup

Para ver la segregación, en la familia S281, de la mutación descrita en *C3orf6*, se desarrolló un test diagnóstico que consistía en lo siguiente: se marcó el oligonucleótido directo para amplificar el exón 11 de este gen con TET, FAM o HEX (Roche). El tamaño de

los productos de PCR de dicho exón, marcados fluorescentemente, se analizó mediante electroforesis capilar en un analizador automático de DNA ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems) (ver apartado 1.2).

2 Análisis del RNA mensajero de *C3orf6*

2.1 RT-PCR

El cDNA de oído interno de ratón de los estadios E17.5, P1 y P14 fue aportado por el Dr. Guy Richardson (Universidad de Sussex, Brighton, Reino Unido). Este cDNA fue obtenido mediante retrotranscriptasa AMV y oligo dT, partiendo de 1 μ g de RNA total (ver procedimiento en Sambrook y Russell 2001), y fue diluido en proporción 1:5 con agua. El cDNA de cerebro de ratón, del estadio P5, fue cedido por la Dra. Isabel Varela Nieto (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid), y se diluyó en proporción 1:10 con agua. Se tomaron alícuotas de cada cDNA y se desnaturalizaron a 96°C durante 5 minutos para eliminar las estructuras secundarias, poniéndolas inmediatamente después en hielo. Para las amplificaciones por PCR se utilizaron diversas combinaciones de los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 3 (ver Tabla 6 en pág. 86 para mayor detalle). Las PCRs se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μ l, utilizando 1.5 μ l de la dilución correspondiente de cDNA, 10 pmoles de cada oligo, 2.5 nmoles de cada dNTP, 0.75 U de polimerasa *FastStart Taq* (Roche) y tampón de reacción 1X con una concentración final de MgCl₂ de 2.5 mM. El programa utilizado en la amplificación de cDNA fue el siguiente: 1) un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 2) 40 ciclos de: desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, anillamiento a 58°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 min/kb, y 3) un ciclo final de elongación a 72°C durante 10 minutos. Para las PCRs *nested* con las parejas de oligos F8/R9 y F6/R2 se utilizaron como molde 1.5 μ l de una dilución 1:100 de la PCR original hecha con los oligos F5/R2, y se siguió el programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 2) 5 ciclos de: desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, anillamiento a 68°C durante 15 segundos para el primer ciclo, con reducción de la temperatura de 1°C/ciclo (*touchdown*), y elongación a 72°C durante 30 segundos, 3) 30 ciclos de: desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, anillamiento a 63°C durante 15 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos, y 4) elongación final a 72°C durante 5 minutos. Para la secuenciación directa de los productos de PCR se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 1.4.3.

2.2 5' RACE-PCR

Para este experimento se partió de 1.7 µg de RNA total de embrión de ratón del estadio E17.5 (cedido por la Dra. Isabel Varela Nieto), aislado mediante el empleo del reactivo TRIZOL[®] (GIBCO BRL), según se describe en Sambrook y Russell (2001). La RACE-PCR se llevó a cabo utilizando el kit *Marathon™ cDNA Amplification kit* (BD Biosciences-Clontech) y la polimerasa *Expand High Fidelity* (Roche). La determinación de la extensión de la región 5' UTR del gen *C3orf6* se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos AP1 (*adaptor primer 1*) del kit y R7, y posterior PCR *semi-nested* con los oligonucleótidos AP2 (*adaptor primer 2*) del kit y R7. En la detección del exón 3b se emplearon los oligos AP1 y R1, y posteriormente, en una PCR *nested*, los oligos AP2 y R2 (ver Tabla 3). Los productos de amplificación se comprobaron en un gel de agarosa al 1%. Las bandas mayoritarias se recortaron, se purificaron con el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), y posteriormente se sometieron a secuenciación directa.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en la amplificación del cDNA de *C3orf6* de ratón.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
F1	CCATGGCCGACGTGAGTG
F4	ACAGAGCAGTGAAGTGTGTCCT
F5	TCTTTGTACCCATGTCATGAAGAAAA
F6	ATTGCAAGAAGAAGAAGAACTTTGGAA
F7	CGTGAGTGTAGATCAGTCCAAGTTG
F8	CCATGTCATGAAGAAAATAATCTCTTG
R1	CCAGAATGGCACACAGAAGGAC
R2	GCCGATCCCTTTTGTGTTGTATT
R4	AGGCTGTTTGTCTTTAATTTTGAG
R5	GGATCTGCTGGCTGACACG
R7	TGCCAAATGATGCTCAATCTCTTGT
R8	CAAGAGATTATTTTCTTCATGACATGG
R9	CATTAGAAGTCGAGCAATTCCAA

2.3 Hibridación *in situ*

El protocolo para la hibridación *in situ* fue adaptado de las siguientes referencias: Wilkinson y Nieto 1993; Nonchev y Maconochie 2000. Para evitar la degradación de las ribosondas y del mRNA del tejido, se trabajó en todo momento, hasta la hibridación de las sondas con el mRNA, en condiciones libres de RNasa, y se empleó agua tratada con DEPC.

2.3.1 Preparación de las sondas

Se amplificó un fragmento del gen *C3orf6*, de aproximadamente 1 kb, partiendo de cDNA de cerebro de ratón del estadio P5 (aportado por la Dra. Isabel Varela Nieto), con la pareja de oligonucleótidos F4/R5 (Tabla 3 y Figura 15 en pág. 87), empleando la DNA polimerasa *PfuTurbo*[®] (Stratagene), que genera extremos romos. Este fragmento se clonó, utilizando la diana EcoRV, en el vector pGEM 5Zf(+) (Promega), que posee un promotor para la RNA polimerasa T7 y otro para la RNA polimerasa SP6, a ambos lados del *polylinker*. El clonaje se realizó en una orientación tal que la polimerasa T7 pudiera transcribir la hebra *antisense*, y la polimerasa SP6 transcribiera la hebra *sense*, tal como ilustra el esquema de la Figura 6. Para el control positivo se empleó un fragmento de unas 430 pb del cDNA de *Tgfb2* de ratón, clonado en pBluescript II KS(+) (Stratagene) con la orientación T7>*sense* y T3>*antisense* (cedido por el Dr. Mark Maconochie, Universidad de Sussex, Reino Unido). Se linearizó cada plásmido con dos enzimas por separado: NotI y SacII para pGEM-*C3orf6* (para transcribir con T7 y SP6, respectivamente), y Sall y SacII para pBluescript-*Tgfb2* (para transcribir con T7 y T3, respectivamente), en un volumen final de 50 µl, utilizando 5 µg de cada plásmido y 25 U de cada enzima. La reacción de transcripción para la síntesis y el marcaje de las ribosondas se realizó en un volumen de 40 µl, empleando 1 µg de plásmido linearizado, ATP, CTP y GTP 10 mM, UTP 6.5 mM, DIG-11-UTP 3.5 mM, 30 U de la polimerasa correspondiente, 40 U de RNasina (Promega), DTT 10 mM y tampón de transcripción 1X, incubando a 37°C durante 6 horas. Las sondas se purificaron con columnas Micro Bio-Spin P-30 Tris (Bio-Rad) y se comprobaron en gel de agarosa al 0.7%, estimándose su concentración por comparación con el marcador de peso molecular λHindIII.

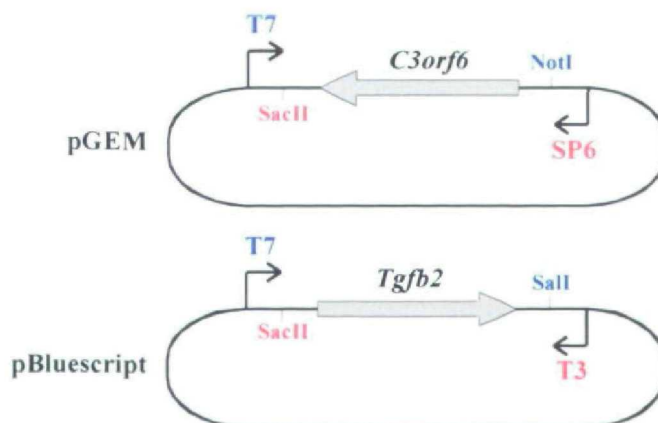


Figura 6. Esquema de los fragmentos de *C3orf6* y *Tgfb2* clonados para sintetizar las sondas de la hibridación *in situ*. En el mismo color se muestran la diana de restricción empleada para linearizar el plásmido y la polimerasa correspondiente utilizada en la transcripción.

2.3.2 Preparación de las secciones de tejido

Se diseccionaron oídos internos de ratón del estadio E17.5 en PBS y, tras dos lavados con este tampón, se fijaron durante toda la noche con paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C. Después se lavaron dos veces con PBS durante 10 minutos en agitación suave y se equilibraron en sacarosa al 30% en PBS. Posteriormente, se embebieron en una mezcla 1:1 de sacarosa al 30% y medio O.C.T. (BDH), y se colocó cada oído en un molde de plástico apropiado relleno con esta mezcla, orientándolo bajo el microscopio con ayuda de unas pinzas. Las muestras se congelaron colocando los moldes sobre nieve carbónica; luego, se extrajeron de los moldes y se hicieron secciones de 16 μm de espesor en un criotomo Reichert-Jung 1800. Las secciones se colocaron sobre portas cargados electrostáticamente (BDH) y se secaron a 37°C durante 2 horas.

2.3.3 Hibridación con la sonda y lavados

Las secciones se rodearon con un rotulador hidrofóbico *ImmEdge*TM (Vector Laboratories) y se lavaron 3 veces con PBT (PBS + Tween 20 al 0.1%). Posteriormente, se incubaron con proteinasa K a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBT durante 5 minutos, y se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.2% durante 5 minutos, tras lo cual se lavaron 3 veces con PBT. Las secciones se prehibridaron a 65°C durante 1 hora con 200 μl de tampón de hibridación (formamida al 50%, SSC 5X pH 5, RNA de levadura a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SDS al 1%, heparina a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EDTA 5 mM, Tween 20 al 0.2% y CHAPS al 0.5%), tras sellar los portas con un cubre *HybriWell*TM (Sigma), en una cámara cerrada. Posteriormente, se retiraron los cubres y el tampón de hibridación, y se colocaron nuevos cubres sobre las muestras, junto con 200 μl de tampón de hibridación con la sonda correspondiente a una concentración de 500 ng/ml. Se incubaron las secciones con la sonda a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente, se retiraron los cubres y se lavaron los portas, en un contenedor de plástico para portas, con solución I (formamida al 50%, SSC 5X pH 5, SDS al 1%) a 65°C, 2 veces durante 30 minutos. Después se hizo un lavado con solución II (NaCl 0.5 M, Tris 10 mM pH 7.5, Tween 20 al 0.1%) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, los portas se incubaron con solución II conteniendo RNasa A a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a 37°C, 2 veces durante 30 minutos. Por último, se hicieron 2 lavados de 30 minutos con solución III (formamida al 50%, SSC 2X pH 5, SDS al 1%) a 65°C.

2.3.4 Detección de los híbridos sonda-mRNA

Por un lado se preparó el anticuerpo anti-digoxigenina, pre-absorbiéndolo con embrión de ratón en polvo. Para ello se añadieron 0.5 ml de TBST (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Tris 25 mM pH 7.5, Tween 20 al 0.1%) a 3 mg de embrión en polvo, y la mezcla se incubó a 65°C durante 30 minutos. Después de enfriarla en hielo, se añadió suero inactivado de oveja al 1% final, medio de bloqueo (Roche) al 2% final y 1 μ l de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche), y se incubó en agitación al menos 1 hora. Posteriormente se centrifugó, y el sobrenadante se añadió a 1500 μ l de TBST con suero inactivado de oveja al 1% y medio de bloqueo (Roche) al 2%, quedando el anticuerpo a una dilución de 1:2000. Por otra parte, se lavaron las secciones 3 veces con TBST conteniendo levamisol 2 mM. Luego se bloquearon con una mezcla de TBST, levamisol 2 mM, medio de bloqueo al 2% y suero inactivado de oveja al 1%, durante al menos 30 minutos. Para la hibridación de las secciones con el anticuerpo, se sellaron los portas con un cubre *HybriWell*TM y se añadieron 200 μ l de la solución con el anticuerpo. Se incubó en una cámara cerrada a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron los portas 3 veces durante 5 minutos, y después 5 veces durante 20 minutos, con TBST más levamisol 2 mM. Luego se lavaron 3 veces durante 15 minutos con NTMT (Tris 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tween 20 al 0.1%) más levamisol 2 mM. Para revelar el anticuerpo, se incubaron las secciones en oscuridad con solución de tinción, conteniendo NTMT, levamisol 2 mM, 4.5 μ l/ml de NBT (Roche) y 3.5 μ l/ml de BCIP (Roche). La reacción fue monitorizada periódicamente bajo un microscopio óptico, y se llevó a cabo durante el tiempo suficiente para conseguir una buena señal, sin permitir que se elevara demasiado el ruido de fondo (unas 12 horas), considerando que había tinción positiva ante la aparición de un precipitado de color morado. Para parar la reacción, se lavaron los portas 3 veces con TBST. Después se fijaron con paraformaldehído al 4% frío durante 5 minutos, y posteriormente se lavaron 2 veces con TBST. Los portas se montaron con cubres utilizando medio *Aquamount* (BDH). Las muestras se visualizaron en un microscopio Axioplan 2 (Zeiss), y se fotografiaron con una cámara SpotTM Junior (Diagnostic Instrument, INC).

3 Anál isis de la proteína Ymer

3.1 Generación de anticuerpos contra Ymer

Se sintetizaron dos péptidos de la proteína Ymer deducida de ratón, uno N-terminal (péptido I, RIQEKKDEDIARLL) y el otro C-terminal (péptido II, NQHSTTWHLPKSES) (CovalAb). Ambos péptidos se inyectaron conjuntamente en dos conejos distintos para la generación de dos anticuerpos policlonales contra Ymer (DOX y DOY), que se purificaron por cromatografía de afinidad (CovalAb). La concentración final era de 100 µg/ml para DOX y de 130 µg/ml para DOY.

3.2 Western blot

3.2.1 Anál isis de la especificidad de los anticuerpos

Para el análisis de la especificidad de los anticuerpos, se corrieron extractos proteicos obtenidos de cresta epitelial interna (GER), estría vascular y modiol o, en condiciones de reducción, en un gel de poliacrilamida al 10% (0.75 mm de espesor), mediante electroforesis SDS-PAGE en un aparato Mini-PROTEAN[®] 3 cell (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular se empleó *Precision Plus Protein™ Dual Color* (Bio-Rad). Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Hybond[™]-P (Amersham Biosciences), mediante *blot* semiseco, a 40 mA durante 45 minutos (Harlow y Lane 1988). La membrana se incubó en solución de bloqueo (3% de leche desnatada en polvo en TBST: NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.2, Tween 20 al 0.05%) con azida sódica 1.5 mM, durante 1 hora en agitación. Posteriormente se añadió el anticuerpo DOX o DOY con una dilución final de 1:400 y se incubó en agitación durante toda la noche. Para los controles negativos, se sustituyeron los anticuerpos DOX o DOY por anticuerpos de conejo (IgGs) a la misma concentración. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TBST, durante 5 minutos en agitación. Luego se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (DAKO), a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo con azida sódica 1.5 mM, durante 1 hora en agitación. Tras 3 lavados con TBST, las membranas se equilibraron en tampón de tinción (MgCl₂ 50 mM, Tris pH 9.5 100 mM, NaCl 100 mM) y posteriormente se incubaron con tampón de tinción más 1 µl/ml de NBT y 1 µl/ml de BCIP, en agitación, hasta aparición de las bandas. La reacción se paró lavando las membranas con abundante agua desionizada.

3.2.2 Análisis de la solubilidad de Ymer

Se prepararon las siguientes soluciones: TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4), HS (NaCl 1.0 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.4), LS (Tris-HCl 10 mM pH 7.4) y TX-100 (Triton X-100 al 1%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4). Para separar las fracciones proteicas con distinta solubilidad, se homogeneizaron 8 cócleas de ratón del estadio P2 en 160 µl de TBS; tras una centrifugación, se obtuvo un sobrenadante (fracción soluble en TBS) y un precipitado; éste se homogeneizó en 160 µl de solución HS, se centrifugó y se obtuvo nuevamente un sobrenadante (fracción soluble en HS) y un precipitado; el procedimiento se repitió sucesivamente con las soluciones LS y TX-100, obteniéndose las fracciones solubles correspondientes. El precipitado obtenido tras la adición de TX-100 se consideró la fracción insoluble. Las fracciones solubles en TBS, HS y LS se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 20% final, a 4°C durante 30 minutos; la fracción soluble en TX-100 se precipitó con 9 volúmenes de acetona fría a -20°C durante 30 minutos; tras una centrifugación, todos los precipitados se lavaron con etanol frío, se secaron y se resuspendieron en tampón de carga para el gel SDS-PAGE. El *western blot* se realizó como se detalla en el apartado 3.2.1, y se reveló con el anticuerpo DOY.

3.3 Inmunohistoquímica

3.3.1 Preparación de las secciones de tejido

Se diseccionaron los oídos internos de ratón en PBS frío y se fijaron durante 1 hora con una mezcla de formaldehído al 3.7% y fosfato sódico 0.1 M (Na_2HPO_4 y $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ en relación molar 4.25:1) a pH 7.3. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS (NaCl 150 mM, fosfato sódico 10 mM (Na_2HPO_4 y $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ en relación molar 4.25:1), pH 7.4). Los oídos de edad mayor que P5 se decalcificaron incubando con EDTA 0.5 M pH 8, a 4°C durante 5-6 días, cambiando la solución cada dos días. Luego, se equilibraron en sacarosa al 30% en PBS. Posteriormente, los oídos se colocaron en placas Petri de 35 mm de diámetro y se embebieron en agarosa de bajo punto de gelificación (tipo VII, Sigma), preparada al 1% en PBS con sacarosa al 18%, y equilibrada en un baño a 45°C. Los oídos se orientaron adecuadamente con ayuda de unas pinzas bajo el microscopio. Una vez solidificada la agarosa, se cortaron bloques conteniendo el tejido y se montaron sobre soportes para criotomo con medio O.C.T. (Tissue Tek[®], Miles Scientific). Los bloques se congelaron con *Cryospray 134* (Bright Instrument), tras lo cual se hicieron secciones de 10 µm de espesor con un criotomo

Reichert-Jung 1800. Las secciones se colocaron sobre portas gelatinizados y se secaron a 37°C durante 1 hora.

3.3.2 Hibridación con el anticuerpo DOY

Las secciones se rodearon con rotulador hidrofóbico *ImmEdge*TM (Vector Laboratories) y se bloquearon con suero de caballo al 10% en TBS conteniendo azida sódica 1 mM, dentro de una cámara húmeda durante 1 hora. El anticuerpo DOY se diluyó 1:100 en TBS con suero de caballo al 10% y azida sódica 1 mM, se centrifugó durante 5 minutos a 4°C para precipitar los agregados, y se obtuvo el sobrenadante. Se retiró la solución de bloqueo de las muestras, se añadió a cada una 50 µl de anticuerpo y se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, los portas se lavaron 3 veces con TBS en un contenedor de cristal para portas, tras lo cual se añadieron a cada sección 40 µl del anticuerpo secundario (de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo) conjugado con FITC (DAKO), a una dilución de 1:100 en TBS con suero de caballo al 10% y azida sódica 1 mM. Se incubó en cámara húmeda durante 1 hora. Posteriormente se lavaron los portas 3 veces con TBS y se montaron los cubres con *Vectashield*[®] *H-1000* (Vector Laboratories). Las muestras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Zeiss), y se fotografiaron con una cámara SpotTM Junior (Diagnostic Instrument, INC).

3.3.3 Determinación de la dilución óptima para DOY

Con el objeto de determinar la concentración óptima de DOY para inmunohistoquímica, se hicieron tinciones de secciones del estadio P2 con una batería de diluciones del anticuerpo, desde 1:10 hasta 1:100.000. Se escogió la dilución 1:100 como la más apropiada, por proporcionar una buena señal con un fondo bajo.

3.3.4 Ensayo de preabsorción de DOY con los péptidos

Ambos péptidos se disolvieron en agua a una concentración de 10 mg/ml. Se incubó el anticuerpo DOY, a una dilución 1:100, con los péptidos I y II, ambos a 2.5 mg/ml, durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. En paralelo se realizó un control sustituyendo los péptidos por agua. Después se centrifugó durante 10 minutos para precipitar posibles inmunocomplejos, y se realizó la inmunohistoquímica con el sobrenadante, tal como se detalla en el apartado 3.3.2.

4 Direcciones web

4.1 Programas de análisis

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*):

- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- ExPASy: <http://ca.expasy.org/tools/blast/>

ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Conserved Domain Search: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

NPS@ (*Network Protein Sequence @analysis*): <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>

- HNN: *Hierarchical Neural Network method, protein secondary structure prediction.*

PeptideMass: <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>

PredictProtein: <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>

PSORT II: <http://www.psort.org/>

ScanProsite: <http://ca.expasy.org/tools/scanprosite/>

SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*): <http://smart.embl-heidelberg.de/>

4.2 Bases de datos

Center for Medical Genetics: <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>

HHIM (*Hereditary Hearing Impairment in Mice*): <http://www.jax.org/hmr/index.html>

Morton Cochlear EST Database: <http://hearing.bwh.harvard.edu/>

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

RESULTADOS

1 Mapeo de un nuevo *locus* de sordera dominante (DFNA44). Identificación del gen responsable

1.1 Características clínicas de la sordera en la familia S281

Este trabajo se inició con el estudio de una familia española de cinco generaciones (S281), procedente de Cádiz, que presentaba un historial de sordera neurosensorial, no sindrómica, de herencia autosómica dominante con penetrancia completa (Figura 7). La familia estaba formada por 40 miembros, 18 de los cuales estaban afectados. La historia familiar y el análisis clínico de los pacientes indicaban que se trataba de una pérdida auditiva bilateral, simétrica y progresiva, que comenzaba en la primera década de la vida, entre los 6 y 10 años de edad (la evidencia clínica más temprana de sordera en la familia se encontró en el individuo V:9, de 6 años). Inicialmente, la pérdida auditiva era moderada y afectaba principalmente a las frecuencias bajas y medias (125-2000 Hz), para luego progresar, involucrando todas las frecuencias (audiograma plano), a una sordera profunda hacia la sexta década (Figura 8A).

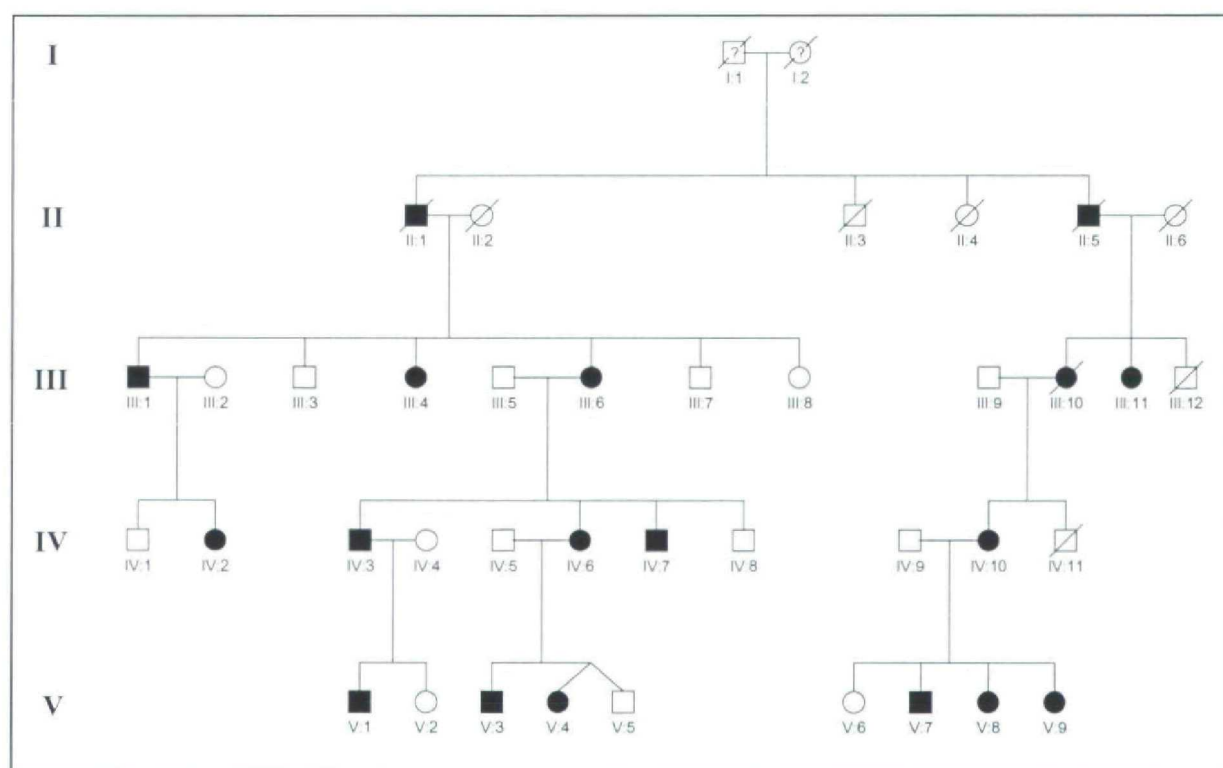


Figura 7. Árbol genealógico de la familia S281. Cada individuo lleva asociado un identificador compuesto por dos números; el primero de ellos, en sistema romano, indica el número de generación. Los cuadrados simbolizan varones, y los círculos, mujeres. Los símbolos en negro representan individuos afectados, y los símbolos en blanco, individuos normoyentes. El *status* clínico de los individuos de la generación I es desconocido. Los individuos V:4 y V:5 son gemelos dizigóticos.

El deterioro del umbral auditivo, obtenido mediante un análisis de regresión lineal basado en todos los audiogramas disponibles ($n=18$) de 12 pacientes, era de 1.1 dB/año en el rango de 125-8000 Hz (Figura 8B). No se encontró evidencia, en ningún paciente, de alteraciones vestibulares o acúfenos ocasionales. Tampoco se hallaron malformaciones del oído interno, como demostró un análisis de tomografía axial computerizada (TAC) del paciente III:1.

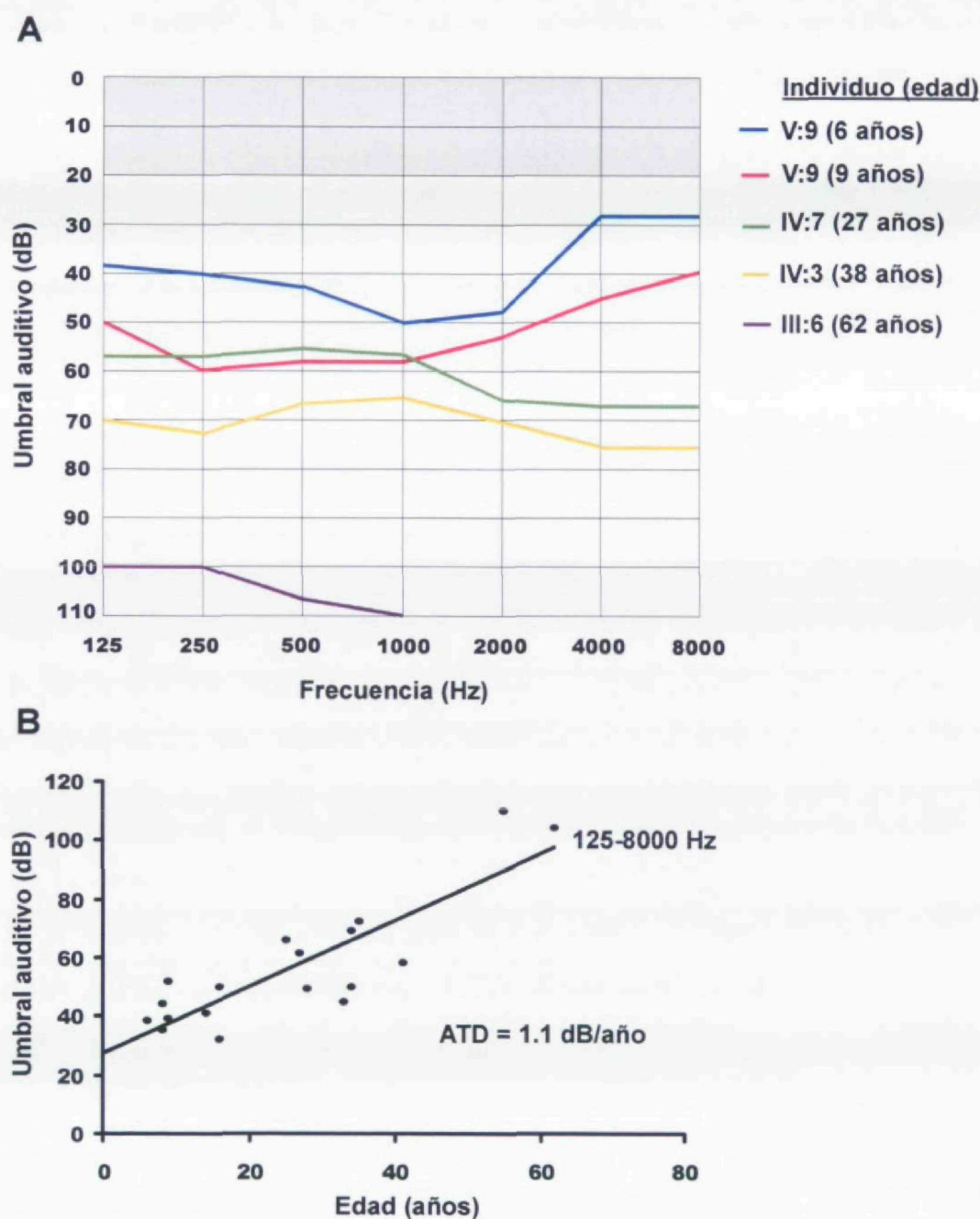


Figura 8. A) Audiograma que representa el umbral auditivo (mínima intensidad de sonido que es capaz de captar el oído) a diferentes frecuencias en varios pacientes de la familia S281, mostrando el deterioro de la audición con la edad (en el caso del paciente V:9 se muestran dos curvas audiométricas correspondientes a diferentes edades). La zona sombreada representa el rango de umbrales auditivos que se consideran dentro de la normalidad. B) Regresión lineal mostrando el umbral auditivo frente a la edad, donde cada punto representa la media del nivel auditivo para ambos oídos (125-8000 Hz), en cada uno de los audiogramas disponibles ($n=18$). La tasa de progresión de la pérdida auditiva (ATD, *annual threshold deterioration*) se expresa en dB/año.

1.2 Mapeo del *locus* DFNA44

Para determinar si la hipoacusia en la familia S281 segregaba con alguno de los *loci* responsables de hipoacusia neurosensorial no sindrómica autosómica dominante (HNNSAD) previamente descritos (DFNA1-20, A22-28, A30, A32, A34, A36-37 y A39), se genotiparon todos los miembros de la familia para marcadores polimórficos de tipo microsatélite que flanquean a dichos *loci*. El análisis de ligamiento a dos puntos, y el análisis de haplotipos, excluyeron en todos los casos la asociación de la sordera a esos *loci* (el individuo V:2, de 6 años y clínicamente normoyente, fue genotipado pero no se incluyó en el análisis de ligamiento por tener una edad igual o inferior a la de aparición de la sordera en la familia), lo que indicaba que un nuevo *locus* podía estar involucrado en este trastorno, y se planteó la localización del gen responsable de la sordera en esta familia.

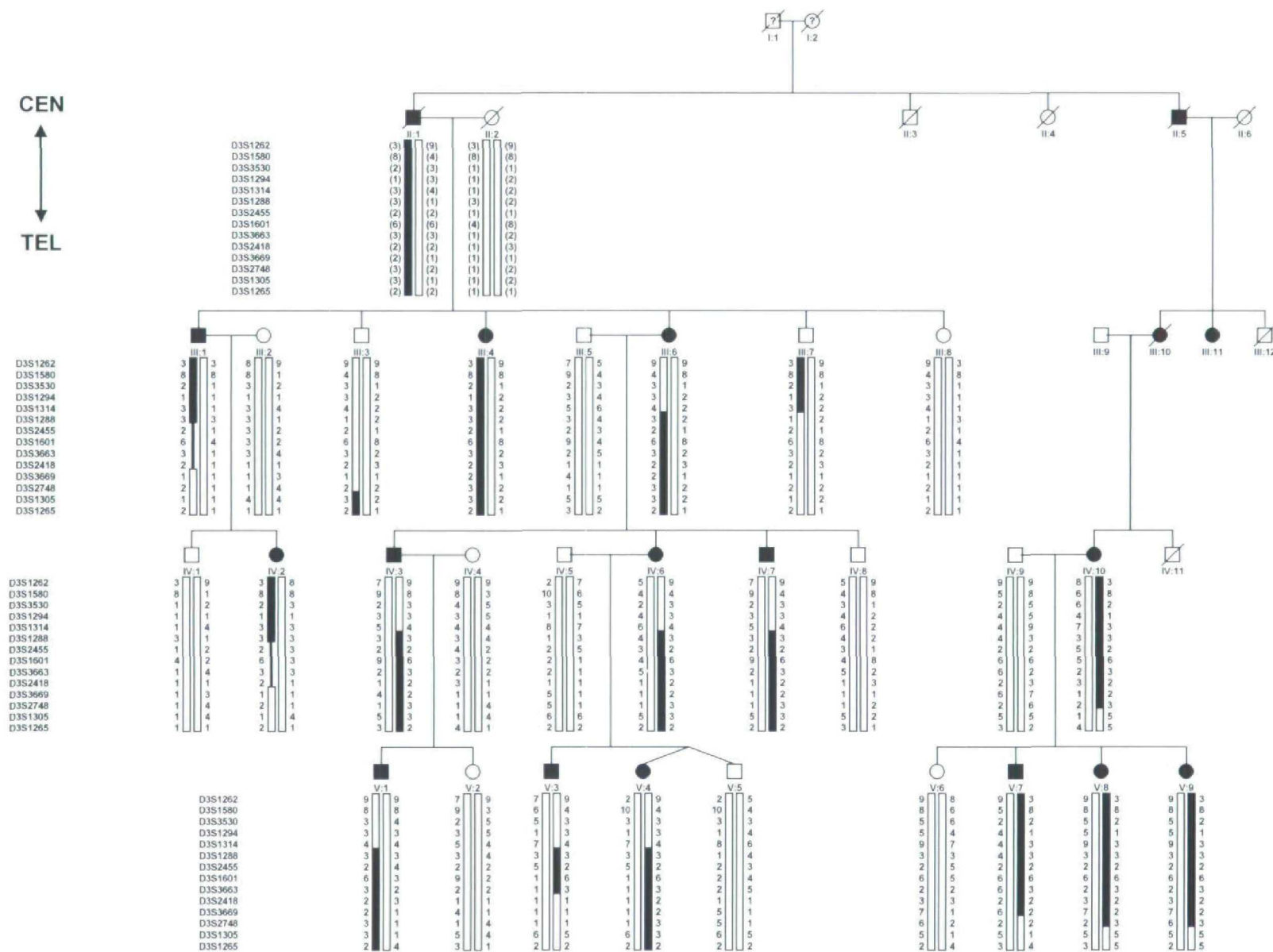
En colaboración con el Dr. Lathrop, del Centro Nacional de Genotipado (Evry, Francia) se realizó un análisis a genoma completo empleando 394 marcadores de tipo microsatélite, separados entre sí por una distancia regular de 10-12 centiMorgan (cM). El análisis de ligamiento a dos puntos reveló un *lod score* máximo de 4.36 a $\theta=0$ para el marcador D3S1601, en la región cromosómica 3q28-29. Con el objetivo de confirmar el ligamiento y acotar la región cromosómica asociada a la sordera, la familia se genotipó con marcadores adicionales que flanquean al D3S1601, obteniéndose *lod scores* significativos ($Z > 3$) a $\theta=0$ para los marcadores D3S1288, D3S2455 y D3S3663 (Tabla 4). Estos valores no se alteraban sustancialmente tras introducir, en el programa de ligamiento, variaciones en la frecuencia del alelo de enfermedad y/o en las frecuencias alélicas de los marcadores. La posición del *locus* asociado a la sordera se delimitó mediante análisis de haplotipos (Figura 9). Dicho análisis reveló que los individuos III:6 y III:7 presentaban una recombinación en el lado centromérico entre los marcadores D3S1314 y D3S1288, que situaba el intervalo crítico desde el marcador D3S1314 hacia el telómero; por otra parte, en el lado telomérico, una recombinación clave en el cromosoma materno del individuo V:3, entre los marcadores D3S3663 y D3S2418, definía el intervalo desde el marcador D3S2418 hacia el centrómero. El *locus* de sordera, por tanto, se situaba en el intervalo comprendido entre los marcadores D3S1314 y D3S2418, separados por una distancia genética de aproximadamente 3 cM y una distancia en el mapa físico de 2 megabases (Mb). Ningún otro *locus* asociado a sordera, tanto sindrómica como no sindrómica, se había descrito en esta región, por lo que se le asignó un nuevo nombre, DFNA44, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura Genética HUGO (HGNC).

Tabla 4. *Lod scores* a dos puntos entre el locus DFNA44 y marcadores de la región 3q28-29.

Marcador	Fracción de recombinación (θ):							Z_{\max}	θ_{\max}
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40		
D3S1262	$-\infty$	1.49	1.94	1.94	1.60	1.11	0.55	1.97	0.07
D3S1580	$-\infty$	-1.68	0.14	0.69	0.87	0.65	0.32	0.88	0.18
D3S3530	$-\infty$	-0.18	1.55	1.98	1.88	1.34	0.61	2.03	0.13
D3S1294	$-\infty$	0.81	1.88	2.06	1.77	1.18	0.52	2.06	0.10
D3S1314	$-\infty$	1.96	2.98	3.08	2.61	1.81	0.85	3.09	0.09
D3S1288	3.82	3.75	3.46	3.09	2.30	1.45	0.56	3.82	0.00
D3S2455	3.94	3.87	3.59	3.22	2.47	1.65	0.77	3.94	0.00
D3S1601	4.36	4.28	3.98	3.59	2.77	1.89	0.92	4.36	0.00
D3S3663	4.20	4.13	3.83	3.44	2.63	1.76	0.80	4.20	0.00
D3S2418	$-\infty$	1.38	1.84	1.84	1.51	1.02	0.45	1.87	0.07
D3S3669	$-\infty$	1.06	2.11	2.26	1.90	1.21	0.43	2.27	0.09
D3S2748	$-\infty$	-0.31	1.42	1.85	1.75	1.21	0.51	1.90	0.13
D3S1305	$-\infty$	-5.06	-1.85	-0.70	0.08	0.23	0.14	0.23	0.30
D3S1265	$-\infty$	-0.73	0.46	0.79	0.84	0.60	0.25	0.87	0.16

1.3 Análisis de genes candidatos

El siguiente objetivo era identificar el gen implicado en la sordera DFNA44 mediante la identificación de la mutación responsable. Para ello, se abordó la estrategia del candidato posicional, basada en la información combinada de la posición del gen y de su posible función o expresión en cóclea, tanto en humano como en otras especies. La región en la que mapea DFNA44 presenta conservación de sintenia con un fragmento del cromosoma 16 de ratón; no obstante, tras una búsqueda en la base de datos HHIM (ver Materiales y Métodos), no se encontró en esta especie ninguna mutación causante de sordera que mapeara en ella. Los únicos tres genes humanos que se habían caracterizado previamente en la región del locus DFNA44 eran: *CLDN16*, *IL1RAP* y *FGF12* (NCBI Map Viewer, Build 28) (Figura 10). Aunque la expresión de estos genes en oído interno no estaba documentada (NCBI, UniGene), las proteínas que codifican presentan similitudes estructurales con otras proteínas involucradas en el sistema auditivo. Por ello, emprendimos el análisis molecular de estos genes en uno de los individuos afectados (III:1) de la familia S281.



UNIVERSIDAD
 AUTÓNOMA DE
 MEXICO
 INSTITUTO DE
 GENÉTICA

Figura 9. Análisis de haplotipos de la familia S281 para marcadores de la región cromosómica 3q28-29. Los alelos para cada marcador aparecen en forma de números (entre paréntesis aquéllos que están inferidos). Los haplotipos se muestran en forma de barras; los segmentos en negro están genéticamente ligados a la sordera. Una línea delgada entre dos segmentos de barra indica falta de informatividad para los marcadores correspondientes, no siendo posible determinar el punto de recombinación.

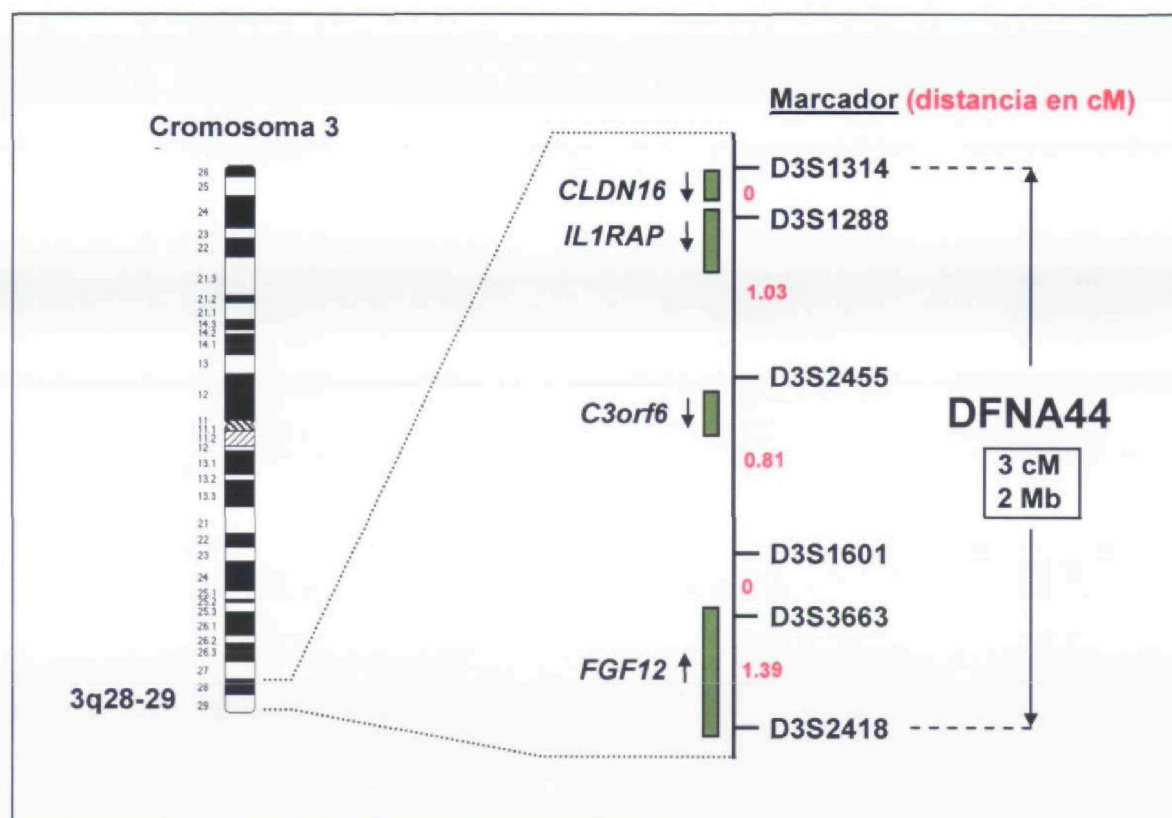


Figura 10. Esquema del intervalo crítico del locus DFNA44. A la derecha se muestran los marcadores; los números en rojo indican las distancias genéticas que hay entre ellos. Los rectángulos verdes representan los genes identificados en el intervalo. Las flechas muestran la orientación de la transcripción de cada gen (hebra con sentido) dentro del cromosoma.

1.3.1 Exclusión de genes candidatos como responsables de la sordera DFNA44

1.3.1.1 *CLDN16*

El gen *CLDN16* (también llamado *PCLN-1*) codifica la claudina-16, que es un componente de las uniones estrechas (Simon y cols. 1999). Éste era un candidato especialmente interesante por dos razones: 1) otro miembro de la familia de las claudinas, la claudina-14, es responsable de la sordera recesiva DFNB29 (Wilcox y cols. 2001), y 2) las uniones estrechas juegan un papel importante en la cóclea, compartimentalizando la endolinfa y aportando un soporte estructural para el neuroepitelio auditivo (Furuse y cols. 1998). El análisis mutacional, por heterodúplex y secuencia, de los cinco exones de *CLDN16* (NCBI: NM_006580), reveló tan sólo una mutación de inserción/delección (c.165_166delGGinsC) en el exón 1, que supuestamente provocaba un cambio en la fase de lectura y un codón de parada prematuro en dicho exón. Este cambio aparecía en heterozigosis en un paciente, III:1, y en dos individuos normoyentes, III:8 y IV:1; por tanto, no podía ser la causa de la sordera en esta familia al no segregar con la enfermedad. Esta mutación ha sido descrita previamente en homozigosis en familias que presentaban una forma recesiva de hipomagnesemia con hipercalciuria y nefrocalcinosis, resultando en fallo renal (Weber y cols. 2000). En la familia S281 no se referían síntomas de enfermedad renal, por lo que los individuos III:1, III:8 y IV:1 serían meros portadores de la mutación.

1.3.1.2 *FGF12*

El gen *FGF12* (también conocido como *FHF-1*) es un homólogo de los factores de crecimiento de fibroblastos implicado en el desarrollo del sistema nervioso (Smallwood y cols. 1996). Aunque no se había estudiado su expresión en oído, varios miembros de la familia FGF juegan un papel importante en diversos estadios del desarrollo del oído interno (Pickles y Chir 2002), lo cual hacía de *FGF12* un candidato potencial. El gen *FGF12* consta de 5 exones y presenta, en humanos, dos isoformas (NCBI: NM_021032 y NM_004113) generadas a través del uso alternativo de dos sitios distintos de iniciación de la transcripción (Muñoz-Sanjuan y cols. 2000). El análisis de los 5 exones por heterodúplex y secuenciación en el paciente III:1, reveló tan sólo 2 variantes polimórficas en el intrón 1, por lo que descartamos también este gen como responsable de la sordera en la familia S281.

1.3.1.3 *IL1RAP*

El gen *IL1RAP* codifica la proteína asociada al receptor de interleukina 1 (IL-1). Esta proteína interacciona con el receptor de IL-1, mediando diversas respuestas celulares a dicha citoquina. Se ha descrito que IL-1 es capaz de prolongar la respuesta inflamatoria en fibrocitos del ligamento espiral, lo cual podría causar daño coclear (Yoshida y cols. 1999). El gen *IL1RAP* consta de 12 exones y expresa dos isoformas, una corta (NCBI: NM_134470), que presenta tan sólo los 9 primeros exones, y una larga (NCBI: NM_002182), que contiene todos los exones. Aunque en principio este gen no era un buen candidato como responsable de sordera, analizamos los 12 exones mediante heterodúplex y secuenciación en el paciente III:1, no encontrando ningún cambio en el DNA que pudiera provocar una alteración en la proteína. Este gen, por tanto, quedaba excluido como responsable de sordera.

Aparte de los tres genes mencionados, el intervalo DFNA44 contenía varias localizaciones genéticas (LOC) con cierta similitud a genes conocidos, y algunos genes hipotéticos de función desconocida (ambos predichos mediante programas informáticos de búsqueda de genes del NCBI). Todos ellos estaban caracterizados de forma parcial, por lo que ninguno fue investigado.

En el año 2003, se posicionó en el intervalo DFNA44 un nuevo gen, *C3orf6* (*chromosome 3 open reading frame 6*), al que recientemente se le ha asignado el nombre *CCDC50* (*coiled-coil domain containing 50*) (Figura 10). Este gen se identificó ensamblando “*in silico*” ESTs de la región 3q28, y su existencia se corroboró amplificando el correspondiente cDNA por RT-PCR (Vazza y cols. 2003). Puesto que un fragmento de este cDNA se había aislado previamente como EST (H88255) partiendo de cóclea fetal humana (*Morton Cochlear EST Database*), consideramos que *C3orf6* era un candidato idóneo para explicar la sordera DFNA44.

1.3.2 Validación del gen *C3orf6* como responsable de la sordera DFNA44

El gen *C3orf6* humano contiene 12 exones y expresa dos isoformas generadas a través de *splicing* alternativo: la más larga (NCBI: AJ557013) incluye los 12 exones y da lugar a una ORF de 1449 nucleótidos; la más corta (NCBI: AJ416916) carece del exón 6 y origina una ORF de 921 nucleótidos. La primera codificaría una proteína de 482 aa; la segunda, una de 306 aa (Vazza y cols. 2003). La secuenciación de los 12 exones en el paciente III:1 reveló, en la ORF del gen, ocho variaciones nucleotídicas respecto a la secuencia publicada (ver Tabla 5), de las cuales siete (localizadas en los exones 3, 6, 7 y 10) correspondían a SNPs (*Single Nucleotide Polimorfisms*). Tres de estas variaciones (c.773T>A, c.908A>G y c.995T>C) comportaban cambio de aminoácido; sin embargo, también aparecían en el individuo normoyente III:8, por lo que no podían ser la causa de la sordera.

Tabla 5. Cambios encontrados en la ORF del gen *C3orf6* en el paciente III:1 mediante secuenciación directa. Todos, excepto c.678A>G (exón 6) y c.1394_1401dup (exón 11), aparecían también en el individuo normoyente III:8.

Exón	Cambio DNA*	Estado	Cambio proteína (deducido)	SNP ID**
3	c.228C>T	heterocigoto	—	(no descrito)
6	c.651T>C	homocigoto	—	rs2028572
	c.678A>G	heterocigoto	—	rs2028573
	c.773T>A	homocigoto	p.Ile258Asn	rs2028574
	c.908A>G	homocigoto	p.Lys303Arg	rs4677728
7	c.995T>C	homocigoto	p.Met332Thr	rs293813
10	c.1269C>A	homocigoto	—	rs364519
11	c.1394_1401dup	heterocigoto	p.Phe468HisfsX37	—

* Estos cambios están referidos a la isoforma larga (AJ557013), correspondiendo la posición +1 a la A del codón ATG de iniciación de la traducción.

** Número de identificación del SNP (NCBI).

En cambio, la última variación, detectada en el exón 11, sólo estaba presente en el paciente III:1, y originaba en la secuencia un patrón de picos dobles compatible con una duplicación en tándem de 8 pb (pares de bases) en heterocigosis. Con la finalidad de confirmar esta mutación y aislar la secuencia de ambos alelos, se clonó en PUC19 el amplificado correspondiente al exón 11 de dicho paciente. La secuenciación de 10 clones positivos (que habían integrado el inserto), demostró la existencia de dos alelos diferentes: uno silvestre, y otro con la mutación c.1394_1401dupCACGGCAT (referida a la isoforma larga, AJ557013), como cabía esperar (Figura 11A y B). Esta duplicación de 8 pb provocaba un cambio en la fase de lectura que

reemplazaba los 15 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína deducida por una nueva secuencia peptídica de 36 aminoácidos (p.Phe468HisfsX37) (Tabla 5, Figura 11C). Aprovechando la diferencia de tamaño entre los alelos silvestre y mutante (8 pb), se diseñó un test sencillo y rápido para detectar la mutación: los amplificados del exón 11, marcados fluorescentemente, se sometieron a electroforesis capilar en un analizador automático de DNA, lo que permitía separar ambos alelos (Figura 11D). Este test se aplicó a todos los miembros de la familia S281, y se confirmó que la mutación estaba presente en todos los individuos afectados de la misma, y ausente en todos los normoyentes (incluyendo el individuo V:2, como cabía esperar del análisis de haplotipos; ver Figura 9). Tampoco se detectó la mutación en 100 individuos control (normoyentes) no emparentados entre sí, por lo que se dedujo que la duplicación c.1394_1401dup era responsable de la sordera en la familia S281. Para estimar la prevalencia de esta mutación en el conjunto de familias españolas con HNNSAD, se aplicó el test diagnóstico a 280 individuos con hipoacusia no emparentados entre sí, pertenecientes a familias afectadas de sordera con herencia dominante (n=135) o de sordera con herencia ambigua (n=145). En ninguno de estos individuos apareció la mutación.

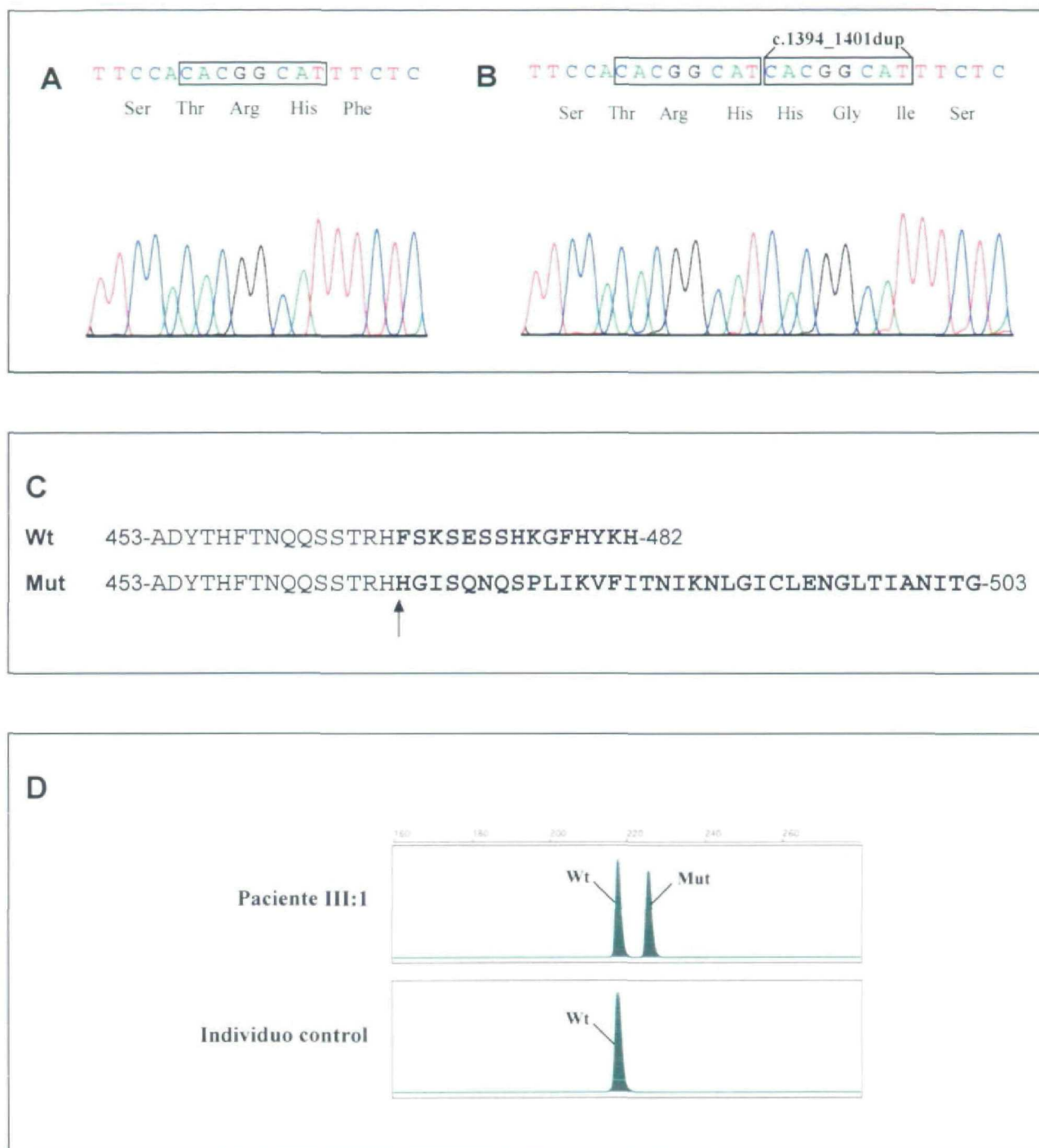


Figura 11. A) y B) Fragmento de secuencia del exón 11 de *C3orf6* del paciente III:1, mostrando la presencia de dos alelos, uno silvestre (A) y otro mutante (B). En un recuadro se muestran los 8 nt que se duplican en la mutación. **C)** Alineamiento de los fragmentos C-terminal de la proteína Ymer deducida para los alelos silvestre (wt) y mutante (mut). La flecha indica el punto donde se produce la mutación. Los aminoácidos en negrita son los que difieren en las proteínas silvestre y mutante. **D)** Test diagnóstico para detectar la mutación en *C3orf6*, basado en la separación de los alelos silvestre y mutante utilizando un analizador automático de DNA.

1.3.2.1 Proteína codificada por el gen *C3orf6*: Ymer

El análisis de la secuencia de aminoácidos que codifica la isoforma larga humana de *C3orf6* (AJ557013) revela que esta proteína no presenta una similitud significativa con ninguna otra proteína conocida (NCBI, ExPASy: BLAST) y que tampoco presenta dominios conservados (NCBI, *Conserved Domain Search*). El análisis “*in silico*” de su estructura secundaria predice un 35% de hélices α , un 4% de hebras β y un 60% de enrollamientos al azar (NPS@, programa HNN; ver Materiales y Métodos). El algoritmo SMART predice una estructura de *coiled coil* entre los aminoácidos 63 y 110, codificada por los exones 3 y 4. La proteína deducida no presenta dominios transmembrana (aunque el segmento codificado por el exón 6 es ligeramente hidrofóbico), ni péptido señal (Vazza y cols. 2003; programa PSORT II). La proteína sería soluble, puesto que el 70% de sus residuos exponen más del 16% de su superficie (programa PredictProtein). Aunque su localización subcelular es probablemente citoplásmica (Vazza y cols. 2003), cabe mencionar que presenta dos posibles señales de localización nuclear, una de ellas entre las posiciones 125 y 129 (codificada por el exón 5; programa PredictProtein), y otra entre las posiciones 394 y 410 (codificada por el exón 9; programa ScanProsite). La proteína presenta, además, una secuencia consenso de fosforilación en tirosina entre las posiciones 138 y 146 (codificada por el exón 5; programas ScanProsite, PredictProtein). Recientemente, la fosforilación en tirosina ha sido demostrada experimentalmente por Blagoev y cols. (2004). Estos autores identificaron la proteína como un efector fosforilado en tirosina involucrado en la red de señalización mediada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y la denominaron Ymer. El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína mutante (p.Phe468HisfsX37), mediante las herramientas ScanProsite y PredictProtein, revela la presencia de un sitio consenso de N-glicosilación en asparagina en el extremo C-terminal, entre las posiciones 500 y 503.

Se han descrito genes ortólogos a *C3orf6* en varias especies, entre ellas en ratón, rata, cerdo, pollo y rana africana, de las cuales se ha aislado el RNA mensajero (NCBI, *Nucleotide*). En ninguna de estas especies se ha descrito la isoforma larga. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos deducidas para todas estas especies, mediante el programa ClustalW, demuestra que hay una región N-terminal muy conservada en todas ellas, codificada por los exones 1-5 (que contiene el dominio de *coiled coil*), y una región C-terminal algo más variable (Figura 12).

<i>H. sapiens</i>	MAEVSIDQSKLPGVKEVCRDFAVLEDHTLAHSLQEQEIEHHLASNVQRNRLVQHDLQVAK	60
<i>S. scrofa</i>	MSEVSIDQSKLPGVKEVCRDFAVLEDHTLAHSLQEQEIEHHLASNVQRNRLVQHDLQVAK	60
<i>M. musculus</i>	MADVSVQSKLPGVKEVCRDFAVLEDHTLAHSLQEQEIEHHLASNIQRNRLVQHDLQVAK	60
<i>R. norvegicus</i>	MADVSVQSKLPGVKEVCRDFAVLEDHTLAHSLQEQEIEHHLASNIQRNRLVQHDLQVAK	60
<i>G. gallus</i>	MAEIGIDQSKLPGVKEVCRDFAVLEDHTLAHNLQEQEIEHHLATNIQRNRLVQHDLQVAK	60
<i>X. laevis</i>	MTEINIDQSKLPGVKEVCRDFAVLEDHTLAHNLQEQEIEHHLATNIQRNRLVKNLQVAK	60
<i>H. sapiens</i>	QLQEE-DLKAQAQLQKRYKDLEQQDCEIAQEIQEKLATIEAERRRIQEKKDEDIARLLQEK	119
<i>S. scrofa</i>	QLQEE-DLKAQAQLQKRYKDLEQQDCEIAQEIQEKLATIEAERRRIQEKKDEDIARLLQEK	119
<i>M. musculus</i>	QLQEE-DLKAQAQLQKRYKALEQHDCEIAQEIQEKLATIEAERRRIQEKKDEDIARLLQEK	119
<i>R. norvegicus</i>	QLQEE-DLKAQAQLQKRYKALEQHDCEIAQEIQEKLATIEAERRRIQEKKDEDIARLLQEK	119
<i>G. gallus</i>	QLQEEEDLKARAQIQKRQKDLERQDSEIAQEIQVKLVFEAEQRRRQEEKDEDIARLLQEK	120
<i>X. laevis</i>	QLQEEEEELRAQARKKNHNELEVLDSIAQEIQDRLVIEAKLRROQEEKDEDIARLLQEK	120
<i>H. sapiens</i>	ELQEEKRRKKHFPEFPATRAYADSYYYEDGDPGSRRARELGSGFSRRCRLQRDQKTVKH	179
<i>S. scrofa</i>	ELQEEKRRKKHFPEASGANAYGDSYYYEDG-----	149
<i>M. musculus</i>	ELQEEKRRKKHTPEFSGGSVFGDNYYHEDG-----	149
<i>R. norvegicus</i>	ELQEEKRRKKHTPEFSGGSASGDNYYYEDG-----	149
<i>G. gallus</i>	ELQEEKRRKKHYEPESQEHKVYEDSYSENG-----	150
<i>X. laevis</i>	---EERRRKKHYPTQEEPYYKDRE-----	142
<i>H. sapiens</i>	KKEKPEHPLENLEEPEQHCSSKRSLSSSSSGKGRDNPHINNEQHERKRSTQERPRRPLLP	239
<i>S. scrofa</i>	-----	
<i>M. musculus</i>	-----	
<i>R. norvegicus</i>	-----	
<i>G. gallus</i>	-----	
<i>X. laevis</i>	-----	
<i>H. sapiens</i>	TISGEVFLSTECDDWETKINHQTRNWEKQSRHQDRLSPKSSQKAGLHCKEVVYGRDHGQG	299
<i>S. scrofa</i>	-----	
<i>M. musculus</i>	-----	
<i>R. norvegicus</i>	-----	
<i>G. gallus</i>	-----	
<i>X. laevis</i>	-----	
<i>H. sapiens</i>	EHRKRRHRPRTPPFSESEEQLHLHLDAGMKPRVMKEAVSTPSRMAHRDQEWYDAEIAARKLQ	359
<i>S. scrofa</i>	-----GVKPRVMKDTVSTPSRVTHRDQEWSDAEIARKLQ	183
<i>M. musculus</i>	-----GMKPRGIKEAVSTPARASHRDQEWYDAEIAARKLQ	183
<i>R. norvegicus</i>	-----GMKSRGINEAVSAPARVSHRDQEWYDAEIAARKLQ	183
<i>G. gallus</i>	-----GTKLRGKTQTVYDKPR---REQELSDAEIARKLQ	181
<i>X. laevis</i>	-----GFRPKGVQDAPISKHTTGLRNQEEHDAHLARRLQ	176
<i>H. sapiens</i>	EEELLATQVDMRAAQVAQDEEIAARLLMAEEKKAYKKAKEREKSSLDKRDPEWKPKTAK	419
<i>S. scrofa</i>	EEELAIQVDMRAAQVAQDEEIAARLLMAEEKKAYKKAREKSSLDKRDPEWKPKTAK	243
<i>M. musculus</i>	EEELLATHVDMRAAQVAQDEEIAARLLMAEEKKAYKKAKEREKSSLDKRDPECKLK-AK	242
<i>R. norvegicus</i>	EEELLATHMDIRAAQVAQDEEIAARLLMAEEKKAYKKAKDREKSSLDKRDPECKSK-AK	242
<i>G. gallus</i>	EEELLANQADQMAAQVAQDEEIAARLLMAEEKKAFKKGKEKEKSSFERKRDQDWDHASE	241
<i>X. laevis</i>	EKEFRANVMDKRAAQMAQDEEIAARYLMDKEEKAYKKSKGREKMTDAKRLLEELBAPDH---	233
<i>H. sapiens</i>	AANSKSKES-DEPHHSKNERPARPPPPIMTDGEDADYTHFTNQSSSTRHFSKSESSHKGKF	478
<i>S. scrofa</i>	SAHSKSKES-DEPHRSKNDRPARPPPPMTDAEDLDYTHFTNQHNSTRHFSKAESSHKGF	302
<i>M. musculus</i>	SAHSKSKESG-DEAHRSKIDRPSRPPPPPTMGLEDTPHFTNQHNSTRHFSKAESSHKGF	301
<i>R. norvegicus</i>	SAHSKSKESG-DETQRAKIDRPSRPPPPAAMAPEDVDPTHFTNQHNSTRHFSKSESSHKGKF	301
<i>G. gallus</i>	SPRSRSKESG-PETQRHKGDKSSRSQP-LLDDFEHAR--YYTSQPSPLRQFSKPEHSPKGS	297
<i>X. laevis</i>	-VRQRTREGQDHHHRSRSDKPYRPLPPPPDTADDDD--YDDDYTN-----	275
<i>H. sapiens</i>	HYKH	482
<i>S. scrofa</i>	HYKP	306
<i>M. musculus</i>	HNKQ	305
<i>R. norvegicus</i>	HNKQ	305
<i>G. gallus</i>	RRKQ	301
<i>X. laevis</i>	----	

Figura 12. Alineamiento múltiple de la proteína deducida Ymer para varias especies: *H. sapiens*, humano (ref. AJ557013); *S. scrofa*, cerdo (AY610008); *M. musculus*, ratón (AJ534985); *R. norvegicus*, rata (AJ534984); *G. gallus*, pollo (NM_001031315); *X. laevis*, rana (BC070599). Los residuos conservados aparecen sombreados. En rojo se indican los exones que codifican cada segmento de la proteína en humano. Los péptidos sintéticos empleados en la generación de anticuerpos contra la proteína de ratón están subrayados.

La similitud de secuencia entre la proteína deducida humana y las de cerdo, ratón, rata, pollo y rana es de un 90%, 84%, 82%, 64% y 56%, respectivamente, estando la proteína muy conservada entre mamíferos.

2 Análisis del RNA mensajero de *C3orf6* en oído interno de ratón

2.1 Confirmación de la expresión de *C3orf6* en oído interno de ratón mediante RT-PCR e hibridación *in situ*

Tanto en humano como en ratón, la expresión del gen *C3orf6* es ubicua, encontrándose en prácticamente todos los tejidos y estadios testados, incluyendo cóclea (NCBI, *UniGene*). Nosotros confirmamos la expresión de este gen en oído interno de ratón, del estadio E17.5¹, mediante RT-PCR (Figura 13).



Figura 13. Gel de agarosa al 1.5%, mostrando los productos de amplificación por RT-PCR del gen *C3orf6* de ratón con los oligonucleótidos F1 y R4 (ver materiales y métodos). El amplificado esperado, de 1672 pb, contiene la ORF completa del gen. Como control positivo de amplificación se empleó cDNA de cerebro, ya que se sabe que *C3orf6* se expresa en este tejido (NCBI, *UniGene*). Carriles: 1, cDNA de cerebro (estadio P5); 2, cDNA de oído interno (E17.5); 3, DNA genómico (no se espera un amplificado de 1672 pb, ya que éste es específico de cDNA) y 4, agua (control negativo). M, marcador de peso molecular.

En paralelo, y como primera aproximación para averiguar qué estructuras del oído interno expresaban este gen, se realizó una hibridación *in situ* sobre secciones de oído interno de ratón del estadio E17.5. Para ello se emplearon dos ribosondas obtenidas de la región 3'UTR de *C3orf6* (ver Materiales y Métodos), marcadas con digoxigenina: una sonda *antisense* (de secuencia complementaria al mRNA, y por tanto capaz de hibridar con éste), y

1. **Nota:** los estadios que comienzan por "E" se refieren a días embrionarios, y los que empiezan por "P" se refieren a días postnatales. El periodo de gestación del ratón es de 21 días.

una sonda *sense* (de secuencia igual a la del mRNA, que serviría como control negativo). Tras la hibridación con el mRNA del tejido, las sondas se detectaron mediante incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y posterior tinción con NBT/BCIP. Como control positivo se emplearon sondas de un fragmento del gen *Tgfb2* de ratón, que se expresa en el oído interno en desarrollo (comunicación personal del Dr. Mark Maconochie). El resultado reveló una fuerte expresión del mRNA de *C3orf6* tanto en las células epiteliales del conducto coclear en desarrollo como en el mesénquima circundante, vislumbrándose una región de tinción negativa correspondiente a la membrana tectoria en formación (Figura 14A). En el control negativo no se detectó señal alguna (Figura 14B). En vestíbulo, tanto en la cresta ampular como en la mácula, se observaba un patrón de expresión similar al de la cóclea (Figura 14C y D). En el control de *Tgfb2* se observó tinción positiva con la sonda *antisense*, y negativa con la *sense*, como cabía esperar.

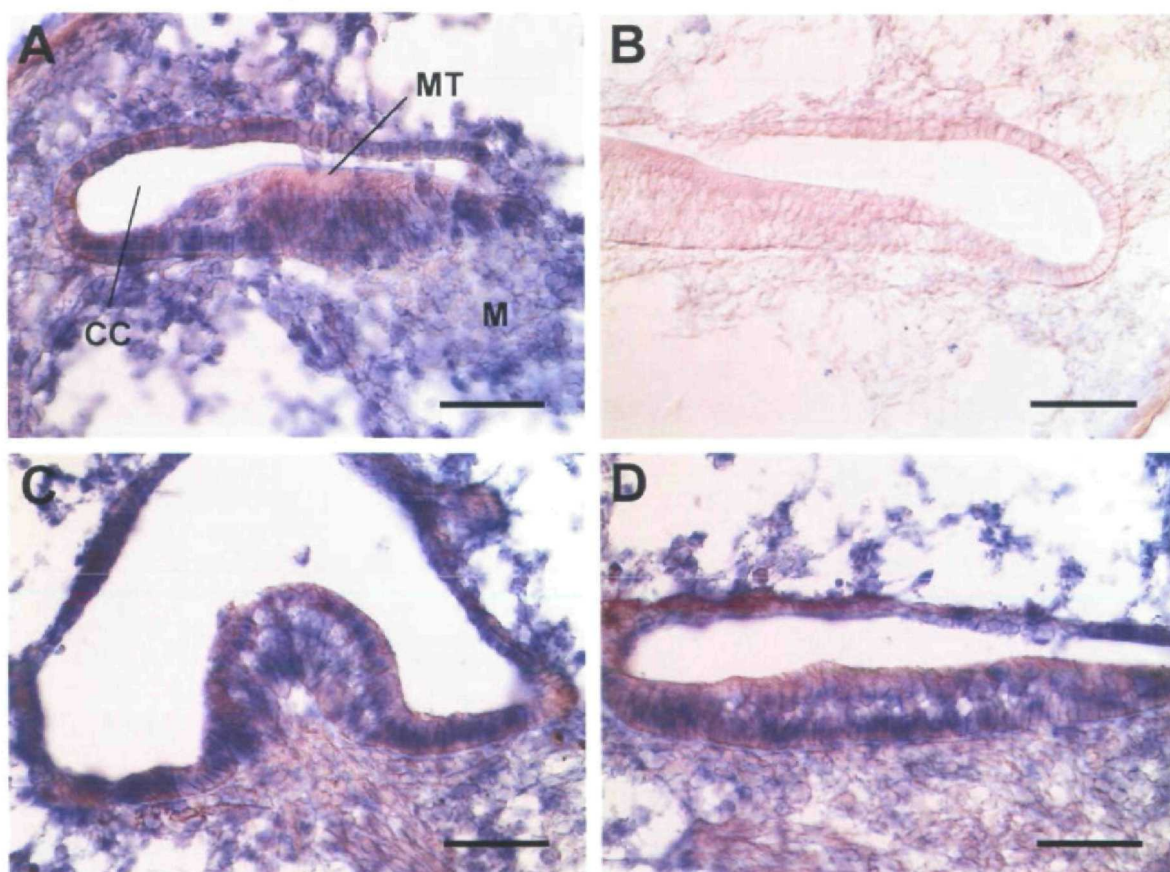


Figura 14. Hibridación *in situ* realizada sobre secciones de oído interno de ratón del estadio E17.5, mostrando el patrón de expresión del mRNA de *C3orf6* en la cóclea (A, sonda *antisense*; B, sonda *sense*) y en el vestíbulo (C, cresta ampular, sonda *antisense*; D, mácula, sonda *antisense*). Abreviaturas: CC, conducto coclear; M, mesénquima; MT, membrana tectoria. Barras de escala = 50 μ m.

2.2 Identificación de las distintas isoformas de *C3orf6* en oído interno de ratón mediante RT-PCR

En humano se conocen dos isoformas de *C3orf6*, siendo la corta (sin exón 6) la predominante (Vazza y cols. 2003). En ratón, hasta la fecha, se han descrito dos isoformas del gen ortólogo al humano, careciendo ambas del exón 6 (Figura 15): la isoforma 1 (AJ534985), descrita por Vazza y cols. (2003), corresponde a la isoforma corta humana, y se expresa en multitud de tejidos, incluido el órgano de Corti (EST BQ567072; NCBI, *UniGene*); la isoforma 2 (NM_001025615) es como la isoforma 1 sin exón 8, y ha sido encontrada en testículo de ratón adulto (NCBI: AK016827). Estas isoformas codifican proteínas de 305 y 290 aa, respectivamente.

Para averiguar qué isoformas de *C3orf6* (incluyendo las dos citadas y otras potenciales) existen en oído interno de ratón, en diferentes estadios del desarrollo (embrionario y postnatal), diseñamos una batería de oligonucleótidos destinados a amplificar la secuencia codificante del cDNA de *C3orf6*, tanto entera como en fragmentos solapantes (ver Materiales y Métodos). Como molde, utilizamos cDNA de oído interno de ratón de los estadios E17.5, P1 y P14. Las parejas de oligonucleótidos empleadas se especifican en la Tabla 6. En los tres estadios se detectó la presencia de ambas isoformas descritas, la 1 y la 2, si bien la amplificación de la ORF completa del gen reveló tan sólo la isoforma 1 (probablemente por ser la más abundante). De hecho, la detección de la isoforma 2 requirió la amplificación de dos fragmentos solapantes, empleando oligonucleótidos específicos (Tabla 6 y Figura 15).

A fin de obtener información potencialmente interesante de la región 5' del gen, se llevó a cabo una 5' RACE-PCR partiendo de cDNA de embrión total de ratón del estadio E17.5, obteniéndose los siguientes resultados: a) no se detectaron exones adicionales corriente arriba del exón 1; b) la región 5'UTR del gen se extendía 123 pares de bases (hasta donde la técnica permitía detectar) desde el ATG de iniciación de la traducción, y c) la secuenciación de uno de los productos de amplificación reveló la existencia de un nuevo exón situado entre los exones 3 y 4. Este exón, que denominamos 3b, está constituido por 46 pb y comienza 243 pb corriente abajo del exón 3 en el genoma de ratón (ver Figura 15).

Dado este hallazgo, nos preguntamos si se expresaban isoformas con exón 3b en oído interno de ratón. Para responder a esto, diseñamos oligonucleótidos específicos que anillaban sobre el exón 3b, y realizamos una serie de PCRs que generaban fragmentos solapantes de la

ORF (Tabla 6 y Figura 15). El resultado fue la aparición de dos nuevas isoformas de mensajero, a las que denominamos 3 y 4. Éstas eran como las isoformas 1 y 2, respectivamente, con la adición del exón 3b. La isoforma 3 se detectó en los tres estadios probados, mientras que la isoforma 4 tan sólo se detectó en P14. La presencia del exón 3b en las isoformas 3 y 4 provoca un cambio de la fase de lectura y, en consecuencia, un codón de parada prematuro al comienzo del exón 4 de la proteína deducida. Sus mensajeros son por tanto candidatos para la degradación mediante el proceso de “*nonsense-mediated mRNA decay*” (NMD), por lo que estas isoformas probablemente no juegan un papel funcional relevante.

Isoforma	PCR original		PCR <i>nested</i>	
	Directo	Reverso	Directo	Reverso
1	F1	R4	-	-
2	F1	R9	-	-
	F6	R2	-	-
3	F7	R8	-	-
	F5	R2	-	-
4	F7	R8	-	-
	F5	R2	F8	R9
			F6	R2

Tabla 6. Parejas de oligonucleótidos empleadas en la amplificación de cada una de las isoformas de *C3orf6* a partir de cDNA de oído interno de ratón. Los oligonucleótidos que se muestran en negrita fueron específicamente diseñados para amplificar las isoformas correspondientes (ver Figura 15). La amplificación de la isoforma 4 requirió el empleo de PCRs *nested*, por ser la más minoritaria de todas. Todos los productos de amplificación se corroboraron mediante secuenciación automática.

En resumen, con esta serie de experimentos se demostró la existencia de al menos 4 isoformas distintas en oído interno de ratón. Las isoformas 1, 2 y 3 se expresan en los tres estadios testados (E17.5, P1 y P14), mientras que la isoforma 4 sólo se detectó en P14 (Figura 15). Además, las cuatro isoformas se amplificaron partiendo de cDNA de cerebro de ratón (estadio P5), lo que indica que ninguna de ellas es específica de oído interno.

Cabe mencionar que en ratón existe un pseudogén procesado de *C3orf6* en el cromosoma 4 (NG_005190, Figura 15). Este pseudogén es muy similar a la isoforma 1, con un 93% de similitud en la secuencia, abarcando desde aproximadamente 100 pb antes del ATG inicial hasta unas 530 pb después del codón de parada. Tras una búsqueda en las bases de datos del NCBI, no se encontró evidencia de que el pseudogén se expresara; sin embargo, en caso de expresarse y traducirse, habría un codón de parada prematuro en el exón 5, generándose una proteína trunca. Todas las parejas de oligonucleótidos empleadas en la amplificación del cDNA de *C3orf6* fueron diseñadas para amplificar el gen y no el pseudogén, en base a las diferencias de secuencia entre ambos. La amplificación específica del gen se corroboró en cada caso mediante la secuenciación de los productos de PCR.

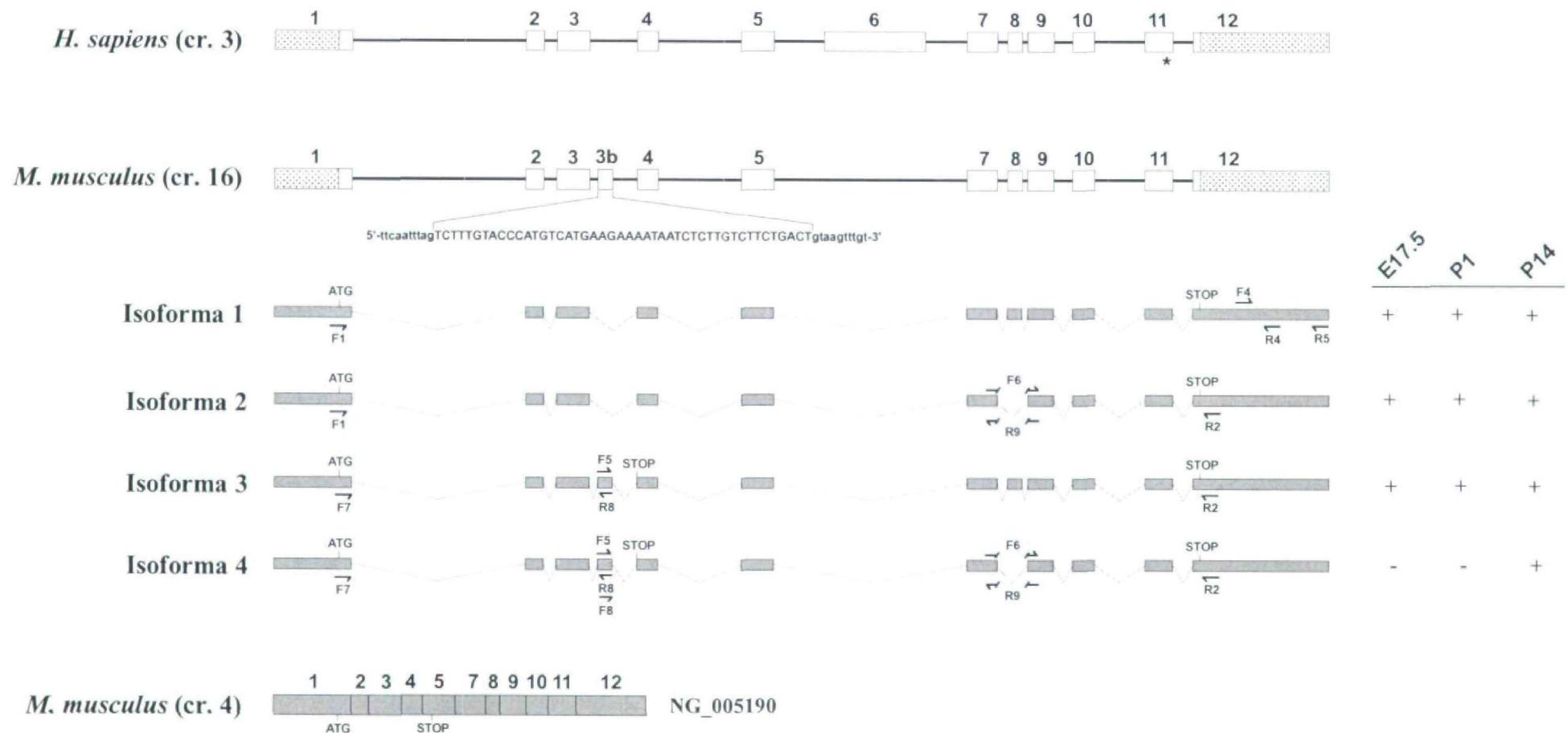


Figura 15. Arriba, esquema de la organización genómica de *C3orf6* de humano y de ratón. Los exones se representan mediante rectángulos. La ORF aparece de color blanco, mientras que las regiones no traducidas están punteadas. El asterisco indica el punto donde se produce la mutación en la familia S281. En el gen de ratón se muestra la secuencia del exón 3b. Debajo, están representadas las 4 isoformas de cDNA encontradas en oído interno de esta especie en varios estadios. Las flechas representan los oligonucleótidos empleados en la amplificación de las isoformas correspondientes (excepto F4 y R5, que fueron los oligonucleótidos utilizados para generar las sondas de la hibridación *in situ*). Los oligonucleótidos F6 y R9 están específicamente diseñados para amplificar las isoformas sin exón 8; ambos están a caballo entre dos exones, con sólo 3 bases en el extremo 3' capaces de anillar en los exones 9 y 7, respectivamente. Los oligonucleótidos F5 y R8 están diseñados sobre el exón 3b, y están diseñados para la amplificación de isoformas que contienen dicho exón. A la derecha de cada isoforma se indica si ésta se ha detectado (+) o no (-) en cada estadio testado (E17.5, P1 y P14). Abajo se muestra el pseudogén procesado de *C3orf6* que existe en ratón.

3 Estudio de la expresión espacio-temporal de la proteína Ymer en oído interno de ratón

3.1 Generación de anticuerpos contra Ymer y comprobación de su especificidad

Para estudiar la expresión de la proteína codificada por *C3orf6* en oído interno de ratón, se generaron dos anticuerpos policlonales de conejo (DOX y DOY), dirigidos ambos contra dos péptidos sintéticos de la proteína deducida de ratón, uno N-terminal (codificado por los exones 4 y 5) y otro C-terminal (codificado por el exón 11; ver Materiales y Métodos). La especificidad de dichos anticuerpos se comprobó por *western blot*, utilizando muestras de diferentes tejidos de oído interno (cresta epitelial interna -GER, *greater epithelial ridge*-, estría vascular y modiolos) de ratón, del estadio P2. Se obtuvieron los siguientes resultados: el anticuerpo DOY reveló una única banda de aproximadamente 38 kDa, que se correspondía con el tamaño esperado para la proteína (unos 35 kDa para las isoformas 1 y 2; programa PeptideMass) (Figura 16A). El anticuerpo DOX reveló esta misma banda y varias bandas adicionales minoritarias, no específicas, que hacían de éste un anticuerpo menos apropiado para detectar la proteína Ymer. Como control negativo, se sustituyeron los anticuerpos DOX y DOY por inmunoglobulinas G de conejo a una concentración similar a la del anticuerpo correspondiente, no observándose ninguna banda en ninguno de los dos casos. La especificidad de DOY se chequeó adicionalmente por inmunohistoquímica (ver Materiales y Métodos y apartado 3.3) sobre secciones de oído interno del estadio P2, preabsorbiendo el anticuerpo con los péptidos contra los cuales se había generado. De ser un anticuerpo específico, los péptidos se unirían a él, bloqueando el sitio de reconocimiento e impidiendo, por consiguiente, su unión al epítipo en el tejido. La hibridación con DOY sin preabsorber reveló un patrón de tinción específico (Figura 17, panel c), que desaparecía cuando se incubaba previamente el anticuerpo con un exceso de ambos péptidos inmunogénicos (Figura 17, panel h). Se consideró, por tanto, que DOY era un anticuerpo específico contra Ymer, y éste fue el anticuerpo que se utilizó en los experimentos que siguieron.

3.2 Análisis de la solubilidad de Ymer

En el siguiente experimento, se quiso evaluar la solubilidad de Ymer. Para ello se hizo un *western blot* utilizando, como muestras, distintas fracciones proteicas de la cóclea, extraídas secuencialmente en soluciones de solubilidad decreciente: tampón Tris salino (TBS), solución de alta concentración salina (HS), solución de baja concentración salina (LS) y Triton X-100 (TX-100). La fracción proteica remanente se consideró la fracción insoluble. Tras un revelado con el anticuerpo DOY, se observó que la banda correspondiente a Ymer, de unos 38 kDa, aparecía únicamente en el carril correspondiente a la fracción soluble en TBS (Figura 16B), confirmando así que se trataba de una proteína totalmente soluble, como predecían las herramientas informáticas de análisis de la secuencia aminoacídica.

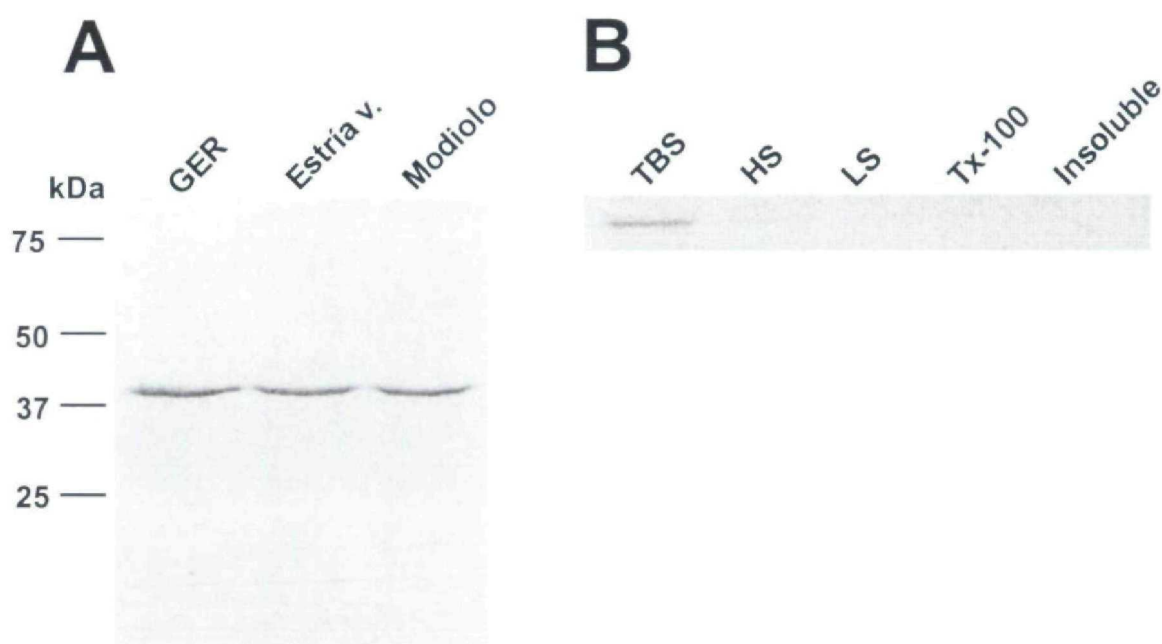


Figura 16. A) *Western blot* realizado para comprobar la especificidad del anticuerpo DOY, utilizando muestras de tejido de cresta epitelial interna (GER), estría vascular y modiolo. B) *Western blot* realizado con tejido de cóclea entera, mostrando la solubilidad de la proteína Ymer en distintas fracciones de solubilidad decreciente: tampón Tris salino (TBS), NaCl 1 M (HS, *high salt*), Tris 10 mM (LS, *low salt*), Tritón X-100 (Tx-100) y fracción insoluble.

3.3 Localización de la proteína Ymer en oído interno de ratón mediante inmunohistoquímica

Para determinar el patrón de expresión espacio-temporal de la proteína Ymer, se hicieron secciones de oído interno de ratón de diversos estadios (embrionarios y postnatales), que se incubaron primero con el anticuerpo DOY y posteriormente con un anticuerpo secundario, marcado fluorescentemente, que reconocía la fracción constante del anticuerpo DOY. En cóclea, se obtuvieron los siguientes resultados (ver Figura 17):

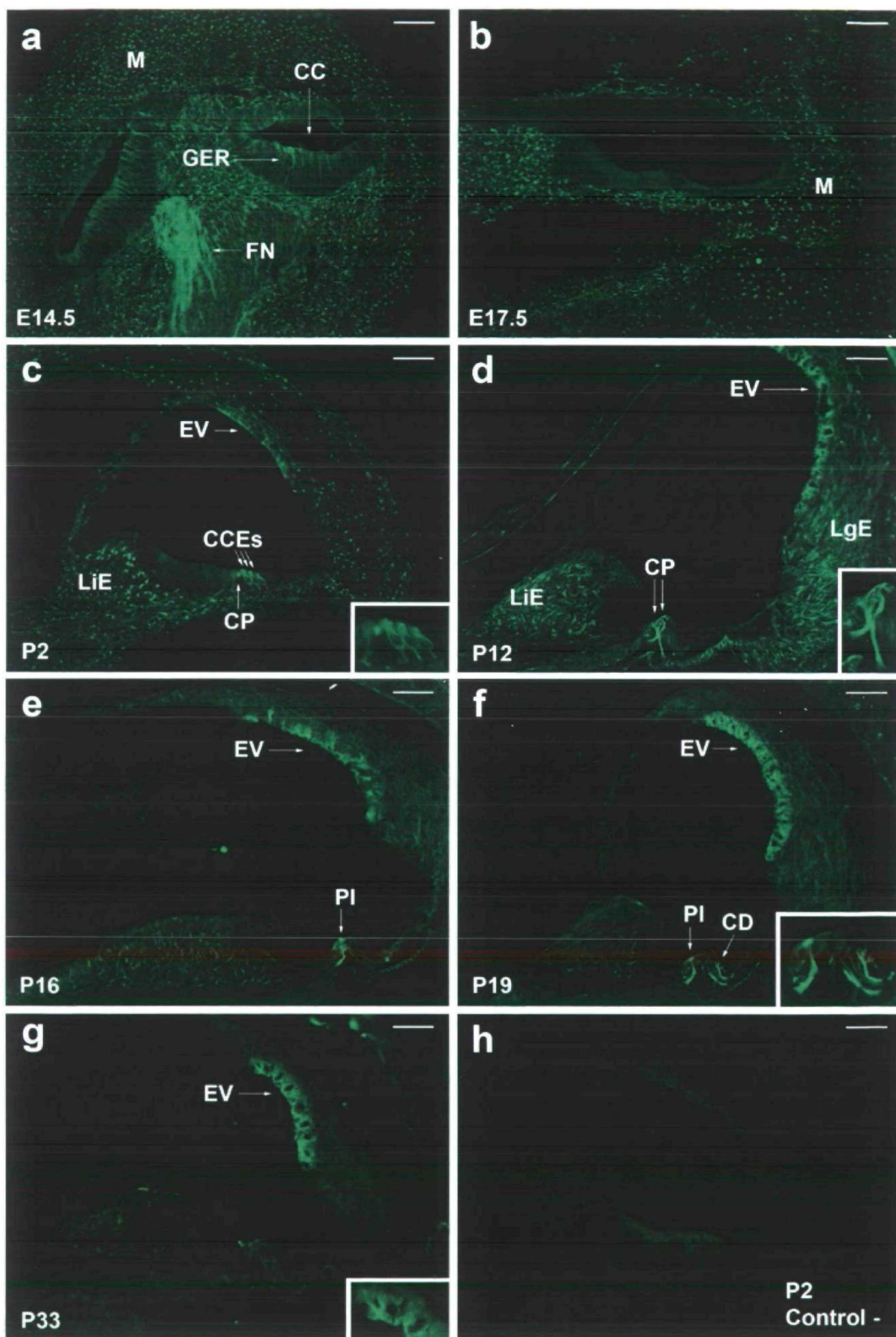
- En **E14.5** (panel a), la proteína se expresaba fuertemente en todo el mesénquima (M), adoptando la forma de acúmulos que aparecían como puntos muy brillantes al microscopio de fluorescencia. Asimismo, se detectó expresión en lo que parecían ser las fibras nerviosas (FN) del ganglio espiral. También se observaban fibras nerviosas con tinción positiva invadiendo el epitelio coclear en la zona de la cresta epitelial interna (GER, *greater epithelial ridge*). Dichas fibras llegaban hasta la superficie del epitelio de cara a la luz del conducto coclear (CC).
- En **E17.5** (panel b) se observó expresión únicamente en el mesénquima (M) que circunda al conducto coclear, similar a la del estadio E14.5.
- En **P2** (panel c), la expresión de Ymer en el mesénquima era menor; no obstante, había una zona de tinción fuerte en el limbo espiral (LiE), en forma de acúmulos. También aparecían zonas de expresión nuevas: la zona apical de las células pilares (CP) en desarrollo, el citoplasma de las células ciliadas externas (CCEs), así como fibras nerviosas que contactaban con la base de estas células, y las células marginales de la estría vascular (EV).
- En **P12** (panel d), Ymer se expresaba fuertemente en las células pilares (CP) internas y externas, en toda su longitud. La tinción en el tejido de origen mesenquimático era mucho más débil, con dos zonas principales de expresión: el limbo espiral (LiE) y la región inferior del ligamento espiral (LgE). La expresión en la estría vascular (EV) era más intensa que en el estadio P2.
- En **P16** (panel e), continuaba la expresión en las células pilares (aunque restringida principalmente a las células pilares internas, PI) y, notablemente, en las células marginales de la estría vascular (EV). En el limbo espiral y el ligamento espiral apenas se veía ya tinción.

- En **P19** (panel f), la expresión era intensa en la estría vascular (EV) y en las células de soporte del órgano de Corti: las células pilares internas (PI) y lo que parecía una estructura perteneciente a las células de Deiters (CD). La tinción era muy débil en el ligamento y el limbo espiral.
- En **P33** (panel g), Ymer se expresaba única y exclusivamente en la estría vascular (EV).

Al igual que en la cóclea, la expresión de Ymer en el vestíbulo (Figura 18) era especialmente intensa en el mesénquima en el periodo embrionario (en forma de acúmulos), y luego disminuía progresivamente hasta prácticamente desaparecer en adulto (P33). La tinción de las fibras nerviosas que inervan el epitelio sensorial era patente en los estadios E17.5 y P2 (Figura 18, paneles a, b y c). En el epitelio sensorial, la proteína comenzaba a detectarse en algunas células hacia E17.5, y luego aumentaba su nivel de expresión, manteniéndose en el adulto (Figura 18, paneles e y f). La proteína se localizaba fundamentalmente en el citoplasma apical.

Para todos los estadios se realizaron controles negativos, sustituyendo el anticuerpo DOY por inmunoglobulinas G de conejo a la misma concentración, no observándose tinción alguna en ningún caso.

Figura 17. Inmunohistoquímica realizada sobre secciones de oído interno de ratón de los estadios E14.5 (a), E17.5 (b), P2 (c), P12 (d), P16 (e), P19 (f) y P33 (g), mostrando el patrón de expresión espacio-temporal de la proteína Ymer en cóclea. En la esquina inferior derecha de los paneles c, d, f y g se muestra una ampliación de los siguientes motivos, respectivamente: células pilares más células ciliadas externas; células pilares; células pilares más células de Deiters; y un segmento de la estría vascular. El panel h muestra un control negativo realizado sobre secciones del estadio P2, preabsorbiendo el anticuerpo con los péptidos inmunogénicos (apartado 3.1 de resultados). Abreviaturas: M, mesénquima; CC, conducto coclear; GER, cresta epitelial interna (*greater epithelial ridge*); FN, fibras nerviosas; LiE, limbo espiral; CP, células pilares; CCEs, células ciliadas externas; EV, estría vascular; LgE, ligamento espiral; PI, célula pilar interna; CD, células de Deiters. Barras de escala = 50 μ m.



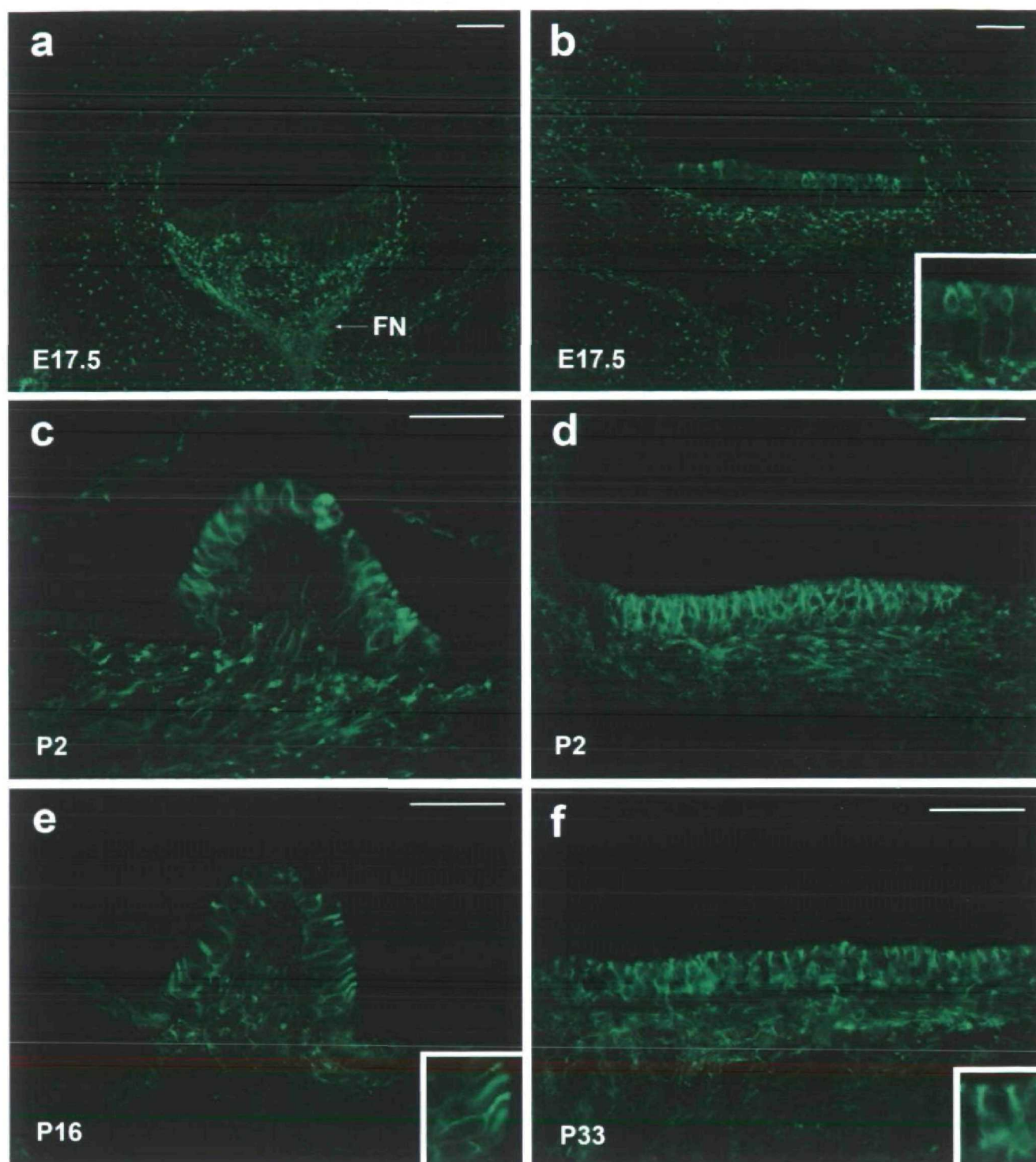


Figura 18. Tinción frente a la proteína Ymer en secciones de vestíbulo de ratón de los estadios indicados. Los paneles a, c y e muestran crestas ampulares; los paneles b, d y f, máculas. FN, fibras nerviosas. Barras de escala = 50 μ m.

Así pues, la expresión de Ymer en la cóclea varía dinámicamente a lo largo del desarrollo, comenzando en el mesénquima y las fibras nerviosas del ganglio espiral en el embrión, para posteriormente encenderse y apagarse progresivamente en distintas estructuras como las células ciliadas externas, las células pilares y las células de Deiters, con una expresión especialmente intensa en las células pilares. En la estría vascular, la expresión comienza débilmente en el estadio P2 para luego aumentar progresivamente hasta P19, manteniéndose en ratón adulto del estadio P33 (Tabla 7). En adulto, por tanto, la estría vascular es la única estructura coclear que expresa Ymer. En el vestíbulo, y similarmente a lo que sucede en la cóclea, la expresión de Ymer es especialmente importante en el mesénquima ótico en el periodo embrionario, y luego va reduciéndose a medida que el tejido va diferenciando. Sin embargo, y al contrario que en la cóclea, en que la expresión de Ymer no se da en el órgano de Corti en estadios avanzados (P33), la proteína sí se expresa en el epitelio sensorial del vestíbulo adulto.

Tabla 7. Nivel de expresión de la proteína Ymer en diversas estructuras de la cóclea de ratón, en función del estadio analizado.

Estructura	Estadio						
	E14.5	E17.5	P2	P12	P16	P19	P33
Mesénquima y estructuras derivadas	+++++	+++++	++++	+++	++	+	-
Fibras nerviosas	+++++	-	-	-	-	-	-
Células ciliadas externas	-	-	++	-	-	-	-
Células pilares	-	-	+	+++++	++++	++++	-
Células de Deiters	-	-	-	-	-	++++	-
Estría vascular	-	-	++	+++	++++	+++++	+++++

DISCUSIÓN

1 Papel funcional de *C3orf6* en el oído interno

En este trabajo, hemos mapeado un nuevo *locus* implicado en HNNSAD, DFNA44, y hemos encontrado la mutación causante de esta sordera en el gen *C3orf6*. Este gen codifica una proteína, Ymer, que está involucrada en la red de señalización del EGF (Blagoev y cols. 2004), aunque su carencia de homología con otras proteínas conocidas hace difícil que se le pueda asignar un papel funcional concreto. En este estudio, mostramos por primera vez que Ymer está involucrada en el sentido de la audición, e investigamos su patrón de expresión en el oído interno como primera aproximación para entender su función en este órgano.

Nuestros resultados revelan que Ymer es una proteína soluble (Figura 16B, pág. 89) y citoplásmica (apartado 3.3 de Resultados; Figuras 17 y 18). Los experimentos de inmunohistoquímica en secciones de oído interno de ratón de diversos estadios pre- y postnatales muestran una expresión dinámica de la proteína en la cóclea; dicha expresión se enciende y se apaga en diversas estructuras para acabar manteniéndose únicamente en la estría vascular en el ratón adulto. Interesantemente, los resultados indican que la expresión de Ymer en esas estructuras coincide con el periodo en el que éstas se están diferenciando (ver Tabla 8). Inicialmente, puede observarse una fuerte expresión de Ymer en el mesénquima ótico que luego disminuye progresivamente a medida que las células se diferencian en fibrocitos del limbo y el ligamento espiral, hasta desaparecer en el ratón adulto. El ganglio espiral es la primera estructura que se diferencia en la cóclea, en torno al día embrionario E14, pudiéndose detectar sus proyecciones nerviosas invadiendo el epitelio coclear hacia E15 (Pujol y cols. 1998). En la Figura 17a (pág. 93) puede comprobarse que Ymer, en E14.5, aparece asociada a las fibras nerviosas procedentes del ganglio espiral que invaden la cresta epitelial interna (GER). Las células ciliadas internas (CCIs) y externas (CCEs) comienzan a diferenciarse en células sensoriales hacia E17, aunque las CCEs experimentan un segundo proceso de maduración en el que adquieren sus propiedades únicas como células motoras (Pujol y cols. 1998). Esta última fase tiene lugar, aproximadamente, en el periodo comprendido entre el nacimiento (P0) y el comienzo de la función coclear (P12) (Belyantseva y cols. 2000). Ymer no parece detectarse en el epitelio sensorial en E17.5, pero sí se halla presente en las CCEs en P2 (hay que tener en cuenta que no hemos estudiado el periodo intermedio). Sin embargo, en E17.5 ya se detecta la presencia del mensajero de *C3orf6* en el epitelio sensorial de la cóclea (Figura 14A, pág. 83), lo que sugiere que la expresión de la proteína podría iniciarse inmediatamente después de este estadio. También en P2 puede observarse una ligera tinción de Ymer en el ápex de las células pilares, cuya maduración comienza hacia P0 (Mueller y

cols. 2002). La expresión de Ymer en estas células alcanza su mayor nivel hacia P12, estadio en el que alcanzan una morfología prácticamente adulta y claramente se observa la apertura del túnel de Corti en la cóclea (Pujol y cols. 1998). La expresión disminuye progresivamente y desaparece en el adulto. En la estría vascular, cuya maduración comienza justo después del nacimiento (a partir del día P1 en rata; Sagara y cols. 1995), Ymer empieza a expresarse hacia P2. En las células de Deiters, que maduran con posterioridad a las células pilares (hacia P4-P6 en gerbo), siguiendo el gradiente medial>lateral de maduración en el órgano de Corti (Ito y cols. 1995), se puede observar expresión de Ymer en P19, estadio en el cual están completando su maduración (Pujol y cols. 1998).

Los datos experimentales demuestran inequívocamente la presencia de Ymer en las células en proceso de diferenciación de diferentes tejidos cocleares. Alcanzada la maduración, Ymer desaparece de todas esas células excepto de la estría vascular, donde la expresión permanece en el adulto² (ver el marcaje en el estadio P33, Figura 17g).

Tabla 8. Comparación entre la expresión de Ymer observada en diversas estructuras cocleares y el estadio aproximado en que se inicia la diferenciación de dichas estructuras.

Estructura coclear	Expresión de Ymer	Inicio de la diferenciación	Especie	Referencia
Ganglio espiral	E14.5	E14	ratón	Pujol y cols. 1998
Fibras nerviosas en epitelio coclear	E14.5	E15	ratón	"
CCEs	1ª fase	-	ratón	"
	2ª fase	P2	ratón	Belyantseva y cols. 2000
Células pilares	P2-P19	P0	ratón	Mueller y cols. 2002
Estría vascular	P2 en adelante	P1	rata*	Sagara y cols. 1995
Células de Deiters	P19	P4-P6	gerbo**	Ito y cols. 1995

* Los estadios de diferenciación coclear en rata y ratón son muy similares (Pujol y cols. 1998).

** En el gerbo, los eventos de maduración del órgano de Corti están retrasados 2-4 días respecto a rata y ratón (Souter y cols. 1997).

Diferentes estudios han demostrado que los factores de crecimiento EGF y PDGF se requieren para el desarrollo y diferenciación del oído (Doetzlhofer y cols. 2004; Lee y cols. 2004; Reigstad y cols. 2005). La respuesta celular a estos factores de crecimiento está mediada por sus correspondientes receptores (EGFR y PDGFR, respectivamente), los cuales

2. En el ratón, se considera que la cóclea alcanza la maduración hacia el estadio P21 (Pujol y cols. 2005).

pertenecen a la familia de receptores tirosín kinasa (RTKs). En rata neonatal del estadio P3, el mensajero de EGFR se expresa en toda la cóclea, con una intensidad mayor en las células ciliadas y de soporte del órgano de Corti, la cresta epitelial interna y el ganglio espiral, que en la estría vascular y el limbo y el ligamento espiral. El mensajero desaparece casi por completo una vez concluida la maduración de esas estructuras, lo que sugiere que la interacción del EGFR con sus ligandos podría jugar un papel importante en el desarrollo del órgano de Corti. (Zine y cols. 2000). Otros autores han demostrado que el EGF y el TGF- α , ambos ligandos del EGFR, se expresan en la rata en el mismo estadio, en el órgano de Corti y en la estría vascular (Malgrange y cols. 1998). El hecho de que Ymer es altamente activado por EGF y, en menor medida, por PDGF (Blagoev y cols. 2004; Kratchmarova y cols. 2005), unido a la presencia de esta proteína en las células cocleares en diferenciación y su desaparición a medida que éstas van madurando, apoya fuertemente la hipótesis de que Ymer participa activamente en los procesos moleculares que conducen a la diferenciación y maduración de las diferentes estructuras cocleares.

La expresión de Ymer en el vestíbulo del ratón se asemeja a la de la cóclea. La tinción en el tejido de origen mesenquimático es fuerte en el periodo embrionario y va disminuyendo a lo largo del desarrollo (Figura 18, pág. 95). En E17.5 se puede observar expresión de Ymer en las fibras nerviosas, así como en algunas células, probablemente ciliadas, que se están diferenciando (proceso que comienza en torno a E14-E18; Rüschi y cols. 1998). En este estadio, se ven claramente en la mácula contactos entre las fibras nerviosas y estas células (Figura 18b). Los contactos entre las fibras aferentes y las células ciliadas son evidentes hacia E16 (Rüschi y cols. 1998). Sin embargo, y a diferencia del órgano de Corti, donde Ymer se expresa solamente durante el periodo de diferenciación, la proteína continúa expresándose en el epitelio sensorial vestibular del ratón adulto.

Es bien conocido que la pérdida de las células ciliadas cocleares en el mamífero adulto es irreversible, mientras que las células ciliadas del vestíbulo conservan cierta capacidad de regeneración, aunque baja (Zine y de Ribaupierre 1999). Teniendo en cuenta que el EGF parece jugar un papel clave en la regeneración de las células ciliadas del vestíbulo (Li y cols. 2003), no sería descartable que la permanencia de Ymer en el epitelio sensorial vestibular del adulto estuviera relacionada con esa capacidad de regeneración.

Puesto que la expresión de Ymer es transitoria durante el desarrollo postnatal del órgano de Corti, no es probable que sea una proteína estructural. Nuestros resultados sugieren

que Ymer, más bien, podría participar en el proceso de formación del citoesqueleto de microtúbulos. Esta hipótesis se basa en los siguientes hechos y observaciones: a) la tubulina es un componente abundante de las células del ganglio espiral y de sus proyecciones nerviosas durante su desarrollo (Ito y cols. 1995), periodo en el que se observa expresión de Ymer en estas estructuras; b) se puede establecer una buena correlación espacio-temporal entre la expresión de Ymer y la adquisición del citoesqueleto de tubulina por los distintos tipos celulares del órgano de Corti, proceso que ocurre en paralelo a su maduración postnatal y progresa en el orden: CCIs>CCEs≈células pilares internas>células pilares externas>células de Deiters (Ito y cols. 1995; Hallworth y cols. 2000); c) más aún, en las células pilares Ymer aparece hacia P2, en forma de una mancha discreta en el ápex de estas células (ver ampliación de la Figura 17c en pág. 93), y es justamente en este estadio y en este sitio donde comienza la nucleación de microtúbulos en las células pilares (Henderson y cols. 1995). Estos microtúbulos se extienden progresivamente hacia la base de la célula. Una vez formado el citoesqueleto de microtúbulos, éste abarca toda la longitud de la célula (Henderson y cols. 1995), patrón que se observa para Ymer en el siguiente estadio testado, P12 (ver ampliación de la Figura 17d); d) tanto en las células pilares como posteriormente en las células de Deiters, la tinción de Ymer es intensa y abarca toda la célula (Figura 17, paneles d y f). Este patrón es compatible con la arquitectura del citoesqueleto, el cual está constituido por haces compactos de microtúbulos y microfilamentos interconectados entre sí que se extienden en ambos tipos celulares en toda su longitud (Slepecky 1996). De hecho, la tinción de Ymer imita sorprendentemente a la tinción de tubulina en las células de soporte cocleares y en las células ciliadas del vestíbulo que se presenta en los trabajos de Tannenbaum y Slepecky (1997) y de Perry y cols. (2003), respectivamente (Figura 17d y f; Figura 18f).

En definitiva, la expresión de Ymer parece guardar una estrecha relación con la emergencia del citoesqueleto de microtúbulos en las células del epitelio sensorial del oído interno. Dada esta hipótesis, podemos especular acerca de la función que Ymer juega en la estría vascular del ratón adulto. Se ha descrito que las células marginales y endoteliales de la estría entran en apoptosis como resultado del daño oxidativo que se produce tras el estrés acústico prolongado (Shi y Nuttall 2003). Por otra parte, la activación de la proteína quinasa C (PKC) mediada por el EGF es capaz de proteger el citoesqueleto de microtúbulos del daño oxidativo en el epitelio gastrointestinal (Banan y cols. 2001). Si este sistema funciona también en el oído interno, Ymer podría ejercer un papel protector frente al daño oxidativo en la estría vascular del ratón adulto.

2 ¿Cuál es la patofisiología de la mutación c.1394_1401dup en *C3orf6*?

La mutación causante de sordera en la familia estudiada consiste en una duplicación de 8 pb que conduce, hipotéticamente, a la síntesis de una proteína en la que el extremo carboxilo es sustituido por un péptido más largo. La mitad amino terminal de la proteína, muy conservada evolutivamente, permanece inalterada en la proteína mutante. Esta región incluye las tirosinas susceptibles de fosforilación y el presunto dominio de *coiled coil*. Los datos experimentales con los que actualmente contamos, unido a la carencia de información sobre la función de esta proteína, no nos permiten establecer cuáles son los mecanismos fisiopatogénicos que subyacen a esta mutación. La hipoacusia observada en los pacientes podría ser debida a un mecanismo de: a) haploinsuficiencia, en que una dosis del 50% de la proteína silvestre no es suficiente para ejercer una función normal; b) dominancia negativa, debido a la pérdida funcional de la proteína silvestre por interacción con la proteína mutante. Hay que tener en cuenta que la proteína Ymer mutada conserva intacto el dominio de *coiled coil*, y que estos dominios, ampliamente versátiles, representan uno de los principales motivos de oligomerización en las proteínas (Burkhard y cols. 2001); o c) ganancia de función, que podría deberse a la toxicidad de la proteína mutante. Aunque no podemos pronunciarnos por ninguno de estos tres mecanismos, cabe destacar que los programas informáticos predicen un sitio de N-glicosilación en el extremo C-terminal de la proteína mutante, y que se han descrito mutaciones cuya patogenicidad se basa en la ganancia de N-glicosilación (Vogt y cols. 2005).

Basándonos en que la expresión de *C3orf6* es ubicua, y que la proteína codificada participa en el desarrollo del oído interno, es lógico preguntarse por qué la hipoacusia detectada en los pacientes de esta familia no está acompañada de deficiencias en otros órganos (sordera sindrómica), o por qué la hipoacusia no es congénita y aparece en el periodo postlocutivo. Existen en la literatura ejemplos de genes con expresión ubicua y participación en el desarrollo del oído interno que provocan HNNSAD de aparición postlocutiva. Por citar un par de ellos, los genes que codifican el activador transcripcional EYA4 (*locus* DFNA10) y el factor de transcripción TFCP2L3 (*locus* DFNA28) (Wayne y cols. 2001; Peters y cols. 2002). Una de las hipótesis que se barajan para explicar este fenotipo es la existencia de sistemas redundantes que suplan la función del gen mutado. No obstante, para responder a estos interrogantes es necesario la realización de estudios celulares y la generación de modelos animales (ratones transgénicos).

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Hemos mapeado un nuevo *locus* de sordera neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica dominante: DFNA44. El *locus* se sitúa en el brazo largo del cromosoma 3, en la banda cromosómica 3q28-29, dentro de un intervalo genético de 3 cM delimitado por los marcadores D3S1314 y D3S2418.
2. La secuenciación de varios genes situados dentro del intervalo, en uno de los pacientes de la familia que estudiamos, permitió identificar la mutación causante de la sordera. Ésta consiste en la duplicación en tándem de un trecho de 8 pb (c.1394_1401dup) de la secuencia codificante del gen *C3orf6* (*CCDC50*). La mutación genera un cambio en la fase de lectura que reemplaza los 15 últimos aa de la proteína deducida por una nueva secuencia peptídica de 36 aa (p.Phe468HisfsX37). La proteína codificada por *C3orf6* se llama Ymer, y es un efector fosforilable en tirosina dentro de la red de señalización del EGF.
3. Analizando la expresión del gen ortólogo a *C3orf6* en ratón, hemos detectado la presencia de 4 isoformas distintas de mRNA, generadas por *splicing* alternativo, en el oído interno de esta especie. Ninguna de ellas es específica de oído. De estas isoformas, sólo dos (la 1 y la 2) parecen tener importancia funcional en el oído interno, en base a su nivel de expresión.
4. La proteína Ymer es soluble y citoplásmica. Aunque no presenta dominios conservados ni una similitud significativa con otras proteínas, contiene una región N-terminal muy conservada en la evolución.
5. La expresión de Ymer en el oído interno de ratón es dinámica, encendiéndose y apagándose en diferentes estructuras, en distintos estadios, para mantenerse únicamente en la estría vascular y en el epitelio sensorial vestibular del animal adulto. El papel funcional de Ymer, por tanto, parece estar relacionado con la diferenciación de las distintas estructuras durante el desarrollo y maduración funcional del oído interno, y con el mantenimiento de la función auditiva y vestibular en adulto.

BIBLIOGRAFÍA

- Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang Y, Keshavarzian A. PKC-beta1 mediates EGF protection of microtubules and barrier of intestinal monolayers against oxidants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(3):G833-G847.
- Barald KF, Kelley MW. From placode to polarization: new tunes in inner ear development. *Development* 2004; 131(17):4119-4130.
- Belyantseva IA, Adler HJ, Curi R, Frolenkov GI, Kachar B. Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 2000; 20(24):RC116.
- Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M. Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 2004; 22(9):1139-1145.
- Bom SJ, Kunst HP, Huygen PL, Cremers FP, Cremers CW. Non-syndromal autosomal dominant hearing impairment: ongoing phenotypical characterization of genotypes. *Br J Audiol* 1999; 33(5):335-348.
- Bryant J, Goodyear RJ, Richardson GP. Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms. *Br Med Bull* 2002; 63:39-57.
- Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 2001; 11(2):82-88.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 2004; 432(7018):723-730.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380(6570):152-154.
- Doetzlhofer A, White PM, Johnson JE, Segil N, Groves AK. In vitro growth and differentiation of mammalian sensory hair cell progenitors: a requirement for EGF and periotic mesenchyme. *Dev Biol* 2004; 272(2):432-447.
- Forge A, Wright T. The molecular architecture of the inner ear. *Br Med Bull* 2002; 63:5-24.

- Friedman T, Battey J, Kachar B, Riazuddin S, Noben-Trauth K, Griffith A, Wilcox E. Modifier genes of hereditary hearing loss. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10(4):487-493.
- Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003; 4:341-402.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141(7):1539-1550.
- Gillespie PG, Walker RG. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* 2001; 413(6852):194-202.
- Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM. Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes. New York: Oxford Univ. Press 1995.
- Hallworth R, McCoy M, Polan-Curtain J. Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of Corti. *Hear Res* 2000; 139(1-2):31-41.
- Harlow E, Lane D., eds. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- Henderson CG, Tucker JB, Mogensen MM, Mackie JB, Chaplin MA, Slepecky NB, Leckie LM. Three microtubule-organizing centres collaborate in a mouse cochlear epithelial cell during supracellularly coordinated control of microtubule positioning. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 1):37-50.
- HHIM, Hereditary Hearing Impairment in Mice, Mouse Mutant Resource Web Site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. May 2005. URL: <http://www.jax.org/mmr/>
- Ito M, Spicer SS, Schulte BA. Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel. *Hear Res* 1995; 88(1-2):107-123.
- Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1(1):21-30.
- Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998; 7(10):1589-1597.
- Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc* 2000; 33(2):51-56.

- Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005; 308(5727):1472-1477.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 1985; 37(3):482-498.
- Lee YW, Ozeki M, Juhn SK, Lin J. Expression of platelet-derived growth factor in the developing cochlea of rats. *Acta Otolaryngol* 2004; 124(5):558-562.
- Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003; 9(10):1293-1299.
- Malgrange B, Rogister B, Lefebvre PP, Mazy-Servais C, Welcher AA, Bonnet C, Hsu RY, Rigo JM, Van De Water TR, Moonen G. Expression of growth factors and their receptors in the postnatal rat cochlea. *Neurochem Res* 1998; 23(8):1133-1138.
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 1993; 46(5):486-491.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3):1215.
- Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet* 2002; 11(10):1229-1240.
- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 630:16-31.
- Mueller KL, Jacques BE, Kelley MW. Fibroblast growth factor signaling regulates pillar cell development in the organ of corti. *J Neurosci* 2002; 22(21):9368-9377.
- Muñoz-Sanjuan I, Smallwood PM, Nathans J. Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J Biol Chem* 2000; 275(4):2589-2597.
- Nonchev SG, Maconochie MK. Spatial analysis of gene expression. In *Mouse Genetics and Transgenics. A practical approach*, by Jackson IJ, Abbott CM. Oxford University Press, 2000; pp. 61-86.

- OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man (TM). McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2005. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Perry B, Jensen-Smith HC, Luduena RF, Hallworth R. Selective expression of beta tubulin isotypes in gerbil vestibular sensory epithelia and neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003; 4(3):329-338.
- Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ, Grundfast KM, San Agustin TB, Madeo AC, Friedman TB, Morell RJ. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet* 2002; 11(23):2877-2885.
- Petersen MB. Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clin Genet* 2002; 62(1):1-13.
- Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 1996; 14(4):385-391.
- Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 2001; 35:589-646.
- Pickles JO, Chir B. Roles of fibroblast growth factors in the inner ear. *Audiol Neurotol* 2002; 7(1):36-39.
- Pujol R, Lavigne-Rebillard M, Lenoir M. Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea. In *Development of the Auditory System*, ed. Rubel EW, Popper AN, Fay RR. Springer, New York, 1998; pp. 146-192.
- Pujol R y cols. Promenade around the cochlea. INSERM y Universidad de Montpellier (última actualización 2005). URL: www.cochlea.org
- Raphael Y, Altschuler RA. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 2003; 60(5-6):397-422.
- Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS J* 2005; 272(22):5723-5741.

- Rüsch A, Lysakowski A, Eatock RA. Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *J Neurosci* 1998; 18(18):7487-7501.
- Sagara T, Furukawa H, Makishima K, Fujimoto S. Differentiation of the rat stria vascularis. *Hear Res* 1995; 83(1-2):121-132.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- Shi X, Nuttall AL. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress. *Brain Res* 2003; 967(1-2):1-10.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999; 285(5424):103-106.
- Slepecky NB. Structure of the Mammalian Cochlea. In *The Cochlea*, ed. Dallos P, Popper AN, Fay RR. Springer, New York, 1996; pp. 44-129.
- Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SH, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18):9850-9857.
- Smith RJ, Green GE, Van Camp G (updated 30 December 2005). Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2005. URL: <http://www.genetests.org>
- Souter M, Nevill G, Forge A. Postnatal maturation of the organ of Corti in gerbils: morphology and physiological responses. *J Comp Neurol* 1997; 386(4):635-651.
- Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. 2nd edition. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 1999.
- Tannenbaum J, Slepecky NB. Localization of microtubules containing posttranslationally modified tubulin in cochlear epithelial cells during development. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; 38(2):146-162.

- Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001; 358(9287):1082-1090.
- Terwilliger JD, Ott J. Handbook of Human Genetic Linkage. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1994.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. January 2006. URL: <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>
- Vazza G, Picelli S, Bozzato A, Mostacciuolo ML. Identification and characterization of C3orf6, a new conserved human gene mapping to chromosome 3q28. *Gene* 2003; 314:113-120.
- Vogt G, Chapgier A, Yang K, Chuzhanova N, Feinberg J, Fieschi C, Boisson-Dupuis S, Alcais A, Filipe-Santos O, Bustamante J, de Beaucoudrey L, Al-Mohsen I, Al-Hajjar S, Al-Ghonaum A, Adimi P, Mirsaeidi M, Khalilzadeh S, Rosenzweig S, de la Calle Martin O, Bauer TR, Puck JM, Ochs HD, Furthner D, Engelhorn C, Belohradsky B, Mansouri D, Holland SM, Schreiber RD, Abel L, Cooper DN, Soudais C, Casanova JL. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet* 2005; 37(7):692-700.
- Wayne S, Robertson NG, DeClau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S, Tranebjarg L, Morton CC, Ryan AF, Van Camp G, Smith RJ. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 2001; 10(3):195-200.
- Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, Meij II, Knoers NV, Cochat P, Sulakova T, Bonzel KE, Soergel M, Manz F, Schaerer K, Seyberth HW, Reis A, Konrad M. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet* 2000; 8(6):414-422.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 2001; 104(1):165-172.

- Wilkinson DG, Nieto MA. Detection of messenger RNA by *in situ* hybridization to tissue sections and whole mounts. In *Guide to techniques in mouse development*, ed. Wassarman PM, DePamphilis ML. Academic Press, 1993; pp. 361-373.
- Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000; 342(15):1101-1109.
- Yoshida K, Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G. Effect of proinflammatory cytokines on cultured spiral ligament fibrocytes. *Hear Res* 1999; 137(1-2):155-159.
- Zine A, de Ribaupierre F. Tissue-specific levels and cellular distribution of epidermal growth factor receptors within control and neomycin-damaged neonatal rat Organ of Corti. *J Neurobiol* 1999; 38(3):313-322.
- Zine A, Nyffeler M, de Ribaupierre F. Spatial expression patterns of epidermal growth factor receptor gene transcripts in the postnatal mammalian cochlea. *Hear Res* 2000; 141(1-2):19-27.

ANEXO

Durante la realización del trabajo presentado en esta Memoria de Tesis Doctoral, he participado también en otras investigaciones que se desarrollaban simultáneamente en el laboratorio. Fruto de todos estos trabajos son los cinco artículos siguientes:

1. Migliosi V*, **Modamio-Hoybjor S***, Moreno-Pelayo MA, Rodriguez-Ballesteros M, Villamar M, Telleria D, Menendez I, Moreno F, Del Castillo I. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2002; 39(7):502-506.
2. **Modamio-Hoybjor S***, Moreno-Pelayo MA*, Mencia A, del Castillo I, Chardenoux S, Armenta D, Lathrop M, Petit C, Moreno F. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28-29. *Hum Genet* 2003; 112(1):24-28.
3. Moreno-Pelayo MA*, **Modamio-Hoybjor S***, Mencia A, del Castillo I, Chardenoux S, Fernandez-Burriel M, Lathrop M, Petit C, Moreno F. DFNA49, a novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23. *J Med Genet* 2003; 40(11):832-836.
4. **Modamio-Hoybjor S***, Moreno-Pelayo MA*, Mencia A, del Castillo I, Chardenoux S, Morais D, Lathrop M, Petit C, Moreno F. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *J Med Genet* 2004; 41(2):e14.
5. Gallo-Teran J, Arellano B, Morales-Angulo C, **Modamio-Hoybjor S**, Moreno-Pelayo MA, Ramirez-Camacho R, del Castillo I, Moreno F. Prevalence of the A1555G mutation in the mitochondrial DNA in patients with cochlear or vestibular damage due to aminoglycoside-induced ototoxicity *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004; 55(5):212-217 (artículo en español).

* Estos autores han contribuido igualmente en estos trabajos.

El segundo artículo describe el mapeo genético del *locus* DFNA44, trabajo que constituye la primera parte de esta Memoria. El trabajo que describe la identificación de *C3orf6* como gen responsable de la sordera DFNA44 y los estudios de expresión de la proteína Ymer en el oído interno de ratón, se enviará próximamente para su publicación. A continuación se adjunta copia de las cinco publicaciones.

LETTER TO JMG

Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss

V Migliosi, S Modamio-Høybjør, M A Moreno-Pelayo, M Rodríguez-Ballesteros, M Villamar, D Tellería, I Menéndez, F Moreno, I del Castillo

J Med Genet 2002;39:502-506

Inherited hearing impairment is a highly heterogeneous group of disorders with an overall incidence of about 1 in 2000 newborns.¹ Among them, prelingual, severe hearing loss with no other associated clinical feature (non-syndromic) is by far the most frequent.¹ It represents a serious handicap for speech acquisition, and therefore early detection is essen-

tial for the application of palliative treatment and special education. Hence genetic diagnosis and counselling are being increasingly demanded.

Non-syndromic prelingual deafness is mainly inherited as an autosomal recessive trait. To date, 28 different loci for autosomal recessive non-syndromic hearing loss have been

Table 1 Sequence of primers used for PCR amplification of human *OTOF* exons

Exon	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Size (bp)
1	GCAGAGAAGAGAGAGGCGTGTGA	AGCTGGCGTCCCTCTGAGACA	203
2	CTGTAGGACGACTCCAGGATGA	CCAGTGTGTGCCCGCAAGA	239
3	CCCCACGGCTCCTACCTGTTAT	GTGTTGGAGTGTAGTCCCTTTTAA	256
4	GAGTCTCTCCCAAGCAGTCACAG	ATTCCCAAGACCAACCCATGT	290
5	ACATATACGGGGTGGAGATTGCTGT	CCCGTGTCTATGGGAGCAGTG	293
6	ACGTGTCCCTTGTCTCTCATT	CCATGACCCGTGCCAGCTCTA	227
7	GTCCCTCTCCCTGCACCTCATT	TCCTAGAGGGCCACGCATCACT	263
8	CAGCCACCTAACCAGTCTTTCA	CCGTCCATGAGCCCTGATTCT	267
9	CCTCTCCCCACAAGCAGTC	CTAGGAATGCTCCAGGAACAAG	281
10	TAGGCTCAGGCAGCTTCTCTCT	GCCACCTCTGTCATATTACA	231
11	TGGGGCTCAGGGCAATGTCT	CACGGCGCTGCCTCTTATCAT	295
12	GCCCTCCCACTTACCACAAA	AGCCTGCACACTCGACTGACT	226
13	CGCTCTGGGTGGGGTGCTCT	ACGGGTGGCAGGTGCTCTCA	306
14	TGGCCCTGGCTGTATGTGCT	CCAGGCCCAACACCCATCA	290
15	CATCCACGCCCCTCACCTGT	GGCATCTCATATTCCTTCCCTCA	295
16	CGCTGCCCTCATTTTGT	GCCCTGGGGGACAGCAGT	292
17	CCGACCTGCCACCTTACTCAA	GGGTCAACGTTCCCTACAAGAGTGA	299
18	GCCTGGTGGGAATGCACTCTA	GAGGCGGGAGGTGAGGTCTTG	305
19	CAGCCTCCATCCTCTGT	CTGGGCAGACCAAGCTTTGT	297
5'UTR	GCTCACCAGAGCCACAGACTACA	CCTCCCAGCCTCCCAAAAT	226
20	TGATCAACAGGGAGGAGGCATT	GCAGGTCCCCTTTGTCCAGTT	244
23	GGGGCTCAATCAGGAGGCTAGA	CTGCCCCCTCCAGCACCTTA	231
25	GGCTGCCATCCTGGAACCT	TCACAGGCTTCTGGTCTCTCAA	221
26	TGCCCTCCCTCTGTCACTT	GCAGGTGGAGTGCAGGGAACAA	256
27	CCAAGAGGCTTCTGGGTGTCTGTT	CCAGCCCTAGGCCCAACT	262
28	GGCAAACTCATGCGGAAAGA	TGGTGGGAGGGGATGACAA	281
29	CATGGCTGGCTCCCTGACTAA	CTCAAAGAAGGGGAGAGGAA	307
30	CGGCTCTCTGCCCTTCT	GCTTGGTGGCAGGTGGATGT	245
31	GCCCCGCCAATCTCACTGT	GATGTGTACACGAAGTTCATGT	259
32	CCAGGCCCAAGTGGCTGATT	GAGTCTGTCACTACCCAGCTCT	250
33	GGTGGAGGCTCTCGGATTGT	GAAGCTGGACAGGAGGGTCTGAGT	263
34	CTTAAGCAGAGCACATGGTGGACTT	CGGGGAGGAGGAGGCAGAGT	256
35	GGCCTTCTGCTCTGCTCATT	CGCCCCACACACCTAGAA	232
36	GCAGGTGGGGCAGGACAAA	GGGCAGTGGTGGGAGGTGAGT	287
37	CTACACCTGACCCACATTGTCTT	CCAGATGGGAGGATGAGGAGACT	222
38	CTGGCAGGGGCACTGAAGATGA	GCAGGGGAGGGCACCAGAA	222
39	CTCCACCTAGCCAACTCTTAA	TGAGGGCAAAGCAGGCACACT	273
40	CCAGCCCTCCAAAGCCTGT	GCCCCCTCTGGCCTCTGAA	260
41	AGTCCCTAGTCCAGCAAAGTCTT	CCCAATACCAAGAACCACAGTC	257
42	GGTATAGGAGGAGAGAGAGCTGAT	GTGGGCCGTGGTGGGAAGT	237
43	CCAAGACCCAGGGCTTCTCT	CTCCACCCACAGCCACCTT	300
44	GGCTGCGGGTCTGGAGATGT	CCCATCCCTGGCTGCTCT	296
45	CACCCAGCCCTGTTCACTCT	CCAGTCCAGCCCTGCCTAC	269
46	GGCAGTAGGACGGGCTGGGACT	GGGTGTCTGGGATCGTCTCTT	266
47	CCTCTGCTCTCTACCTTCTATA	CCCTTGGTCCAGAGGAAGTAAG	264
48	TGACCGGCTCTCTTCCACTT	GGGAAAGAGTCCAAGCCACTGAAA	279

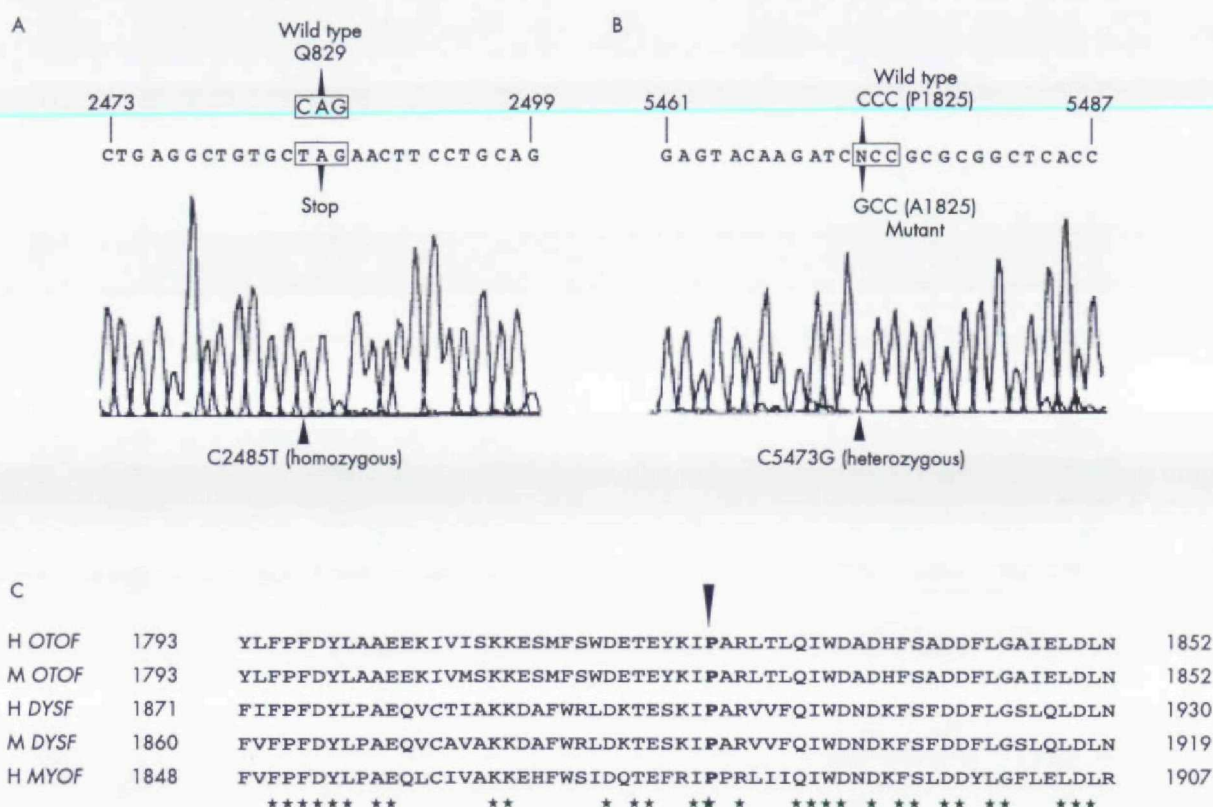


Figure 1 Novel deafness causing mutations in the *OTOF* gene. (A) Direct sequencing of the coding strand of exon 22 from patient S185-03, homozygous for the Q829X mutation. Nucleotide and amino acid numbers all refer to the long isoforms (accession number AF183185). (B) Direct sequencing of the coding strand of exon 44 from patient S244-05, heterozygous for the P1825A mutation. (C) Comparison of sequences of the sixth Ca²⁺ binding C2 domain in different members of the mammalian family of proteins sharing homology with *Caenorhabditis elegans* fer-1. H, human; M, mouse; *OTOF*, otoferlin; *DYSF*, dysferlin; *MYOF*, myoferlin. An asterisk denotes residues that are identical in all of the five compared sequences. The proline 1825 residue is indicated in bold. Accession numbers of the compared sequences: AF183185, AF183184, AF075575, AF188290, and AF182316.

reported and 10 genes have been identified.² Mutations in the gene encoding connexin-26 (*GJB2*, *DFNB1* locus) are responsible for up to 50% of all cases of autosomal recessive deafness, with a frequent mutation (35delG) accounting for up to 86% of the *GJB2* mutant alleles in several populations.³⁻¹⁰ Other mutations, 235delC and 167delT, account for the majority of *GJB2* mutant alleles among the Japanese¹¹ and Ashkenazi Jewish populations,¹² respectively. However, little is known about the individual contribution of other genes and their mutations to the remaining uncharacterised cases. Two factors explain this lack of knowledge. First, most of the deafness genes identified so far are large, with many exons and no mutational hotspots, a problem that hampers routine molecular diagnosis. Second, the recent impressive progress in the investigation of genetic deafness has been the result of a research strategy based on the study of large pedigrees with many affected subjects.¹³ As a consequence, for most of the genes identified so far, genetic linkage has been reported only for a few families, and a small number of mutations have been published.¹⁴⁻²³ In contrast, most of the families asking for a genetic diagnosis are small, with only one or two affected members, which makes linkage analysis inconclusive. To make the results of the basic investigation available to these small families, research should concentrate on the finding of the most frequent mutations in each separate gene in a given population, and on the development of simple tests, specific for each frequent mutation.

In this study, we have investigated the gene encoding otoferlin (*OTOF*, locus *DFNB9* on 2p22-p23)¹⁶ through a strategy based on haplotype analysis of small families followed by

mutation detection in those cases in which the results were compatible with linkage to *DFNB9*. This approach has allowed us to identify a novel mutation, Q829X, the third most frequent mutation causing prelingual deafness reported so far in the Spanish population.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-eight independent nuclear families from Spain, with non-syndromic, prelingual, sensorineural hearing loss were enrolled in the study. In six of them, the parents were consanguineous. At least one patient from each of these 28 families had been previously tested for mutations in the connexin-26 gene by heteroduplex analysis and DNA sequencing, the result being negative. Informed consent was obtained from all the subjects included in this study. Clinical examination of the patients excluded syndromic features, as well as putative environmental causes of their hearing loss. Conductive hearing loss was ruled out by otoscopic examination, tympanometry with acoustic reflex testing, and use of the tuning fork tests. Pure tone audiometry was performed to test for air conduction (frequencies of 250-8000 Hz) and bone conduction (frequencies of 250-4000 Hz). DNA was extracted from peripheral blood samples from all members of each family. Subjects were genotyped for microsatellite markers D2S158, D2S2223, D2S2350, and D2S174, close to the *OTOF* gene on 2p22-p23 (genetic distance of 0 cM).^{24,25} We used primers and PCR conditions previously reported,²⁴ but in each case one of the primers was labelled with a fluorescent dye. Amplified alleles were resolved by capillary electrophoresis in an ABI

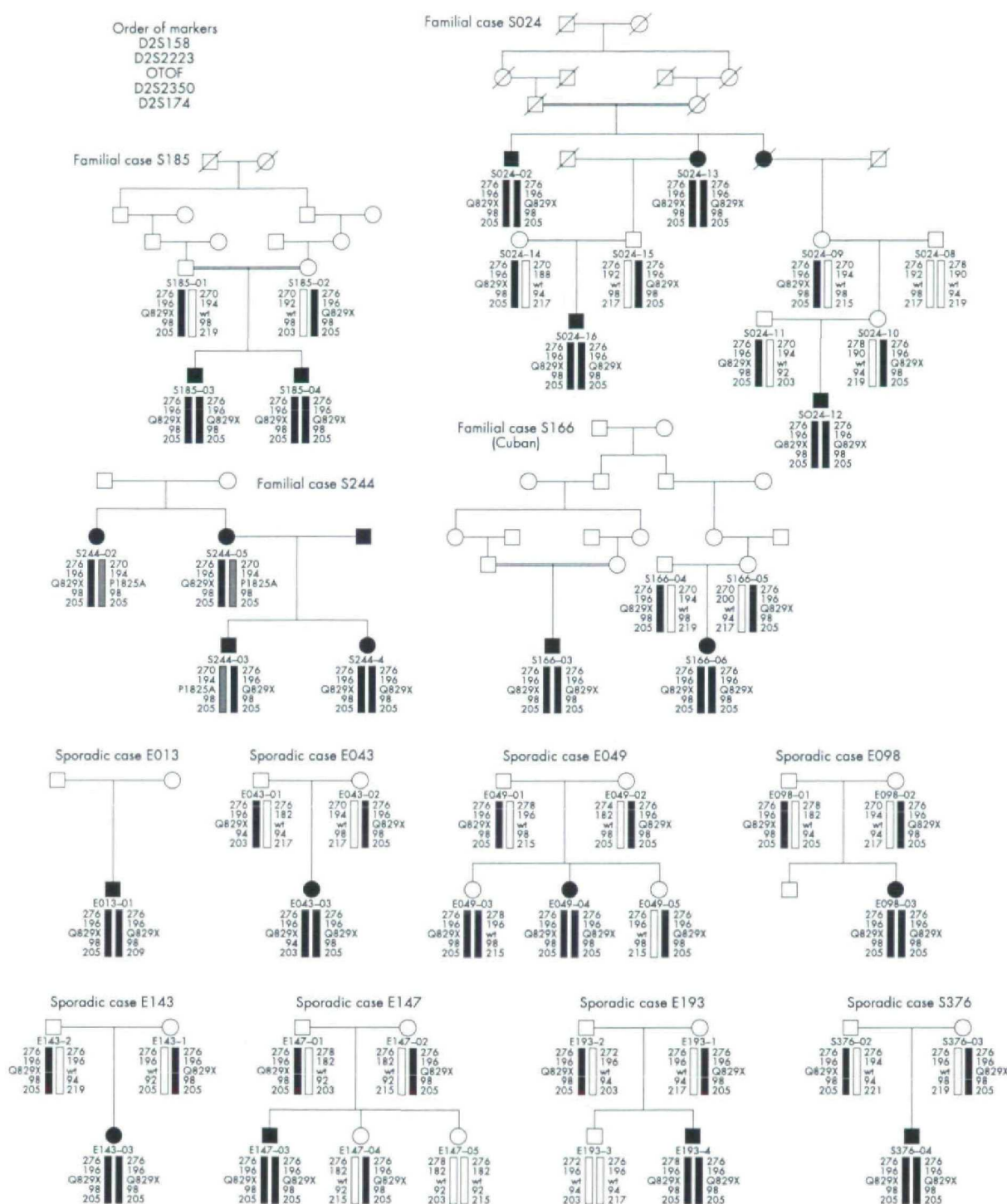


Figure 2 Pedigrees of the familial and sporadic cases carrying mutations in the *OTOF* gene. Haplotypes are indicated by vertical bars. In black, the haplotype associated with the disease. Allele numbers indicate allele size, using as reference CEPH subject 134702.²⁴

Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The analysis of the haplotype defined for these markers excluded linkage to DFNB9 in 20 families, it was inconclusive in two families, and it showed compatibility with linkage in the remaining six families (including one with consanguineous parents, family S185).

In these six families with putative linkage to DFNB9, an exon by exon screening for mutations in the *OTOF* gene was

carried out. Mutation detection was performed by heteroduplex analysis^{26, 27} of PCR products from one patient and one parent in each family, followed by DNA sequencing of the positive cases. Primers for PCR amplification of each exon have been previously reported.^{18–20} However, with the exception of exons 21, 22, and 24, we designed new primers in order to obtain amplification products of the appropriate size for our mutation detection technique (table 1).

RESULTS

In family S185, a C to T transition at nucleotide 2485 was found in exon 22 (fig 1A). This mutation results in the substitution of a glutamine codon by a premature stop codon (Q829X). Both parents of family S185 were carriers of the mutation and their two affected children were homozygous (fig 2). The Q829X mutation was not found in 200 unrelated Spanish controls with normal hearing. No other pathogenic mutation was detected in the remaining five families, but the screening showed several polymorphic changes in the *OTOF* open reading frame: six of them are silent (A372G, G945A, C2580G, G2736C, C5391T, and C5655T) and two others produce amino acid substitutions (C244T and C2317T). The C244T polymorphism results in the substitution of arginine 82 by a cysteine residue (R82C). It was found in seven out of 10 unrelated controls with normal hearing. On the other hand, the C2317T polymorphism results in the substitution of arginine 773 by a cysteine residue (R773C), and it was found in eight out of 46 unrelated controls with normal hearing.

A specific test was designed for easy screening of the novel Q829X mutation. Exon 22 was PCR amplified using previously reported primers. The amplification product (298 bp) was then digested with the *BfaI* restriction endonuclease, according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs), and the digestion fragments were resolved by electrophoresis on a 3% agarose gel (fig 3). In the wild type allele there is one *BfaI* site, digestion resulting in two fragments of 291 bp and 7 bp. The Q829X mutation creates an additional restriction site, which divides the 291 bp fragment into two parts (168 and 123 bp). We used this test to screen a collection of 269 unrelated cases of autosomal recessive hearing loss negative for mutations in the connexin-26 gene. These included 93 familial cases and 137 sporadic cases from Spain and 16 familial and 23 sporadic cases from Cuba. A case was considered sporadic when there was only one affected person in the pedigree. We found the Q829X mutation in 11 cases: two Spanish familial cases, eight Spanish sporadic cases, and one Cuban familial case. The mutation was found in homozygosity in all of these cases, except in the Spanish family S244 (fig 2), in which there were homozygous and heterozygous patients. So an exon by exon screening for mutations in the *OTOF* gene was performed on one of the heterozygous patients from family S244. A C to G transversion at nucleotide 5473 was found in exon 44 (fig 1B). This mutation results in the substitution of proline 1825 by an alanine residue (P1825A), and it was not found in 100 unrelated Spanish controls with normal hearing. The mutation was also not found in the 258 unrelated cases of recessive deafness that remained uncharacterised after the Q829X screening.

Given the frequency of the Q829X mutation in our sample, we investigated its evolutionary origin. All the families carrying the Q829X mutation were genotyped for microsatellite markers D2S158, D2S2223, D2S2350, and D2S174, and the corresponding haplotypes were deduced (fig 2). Considering the consanguinity observed in three of these families, there are 24 independent chromosomes carrying the mutation (22 Spanish and two Cuban). In 20 Spanish and in the two Cuban chromosomes, the Q829X mutation is associated with the 276-196-98-205 haplotype, which is not represented among the 25 wild type chromosomes from the families included in the study. In two other cases, the mutation is associated with haplotypes 276-196-98-209 and 276-196-94-203 that may be recombinant derivatives of the most common Q829X associated haplotype. These results strongly suggest that the chromosomes carrying the Q829X mutation share a common ancestor. This founder effect would not be the consequence of geographical isolation, since our families with the Q829X mutation are distributed all over Spain and Cuba.

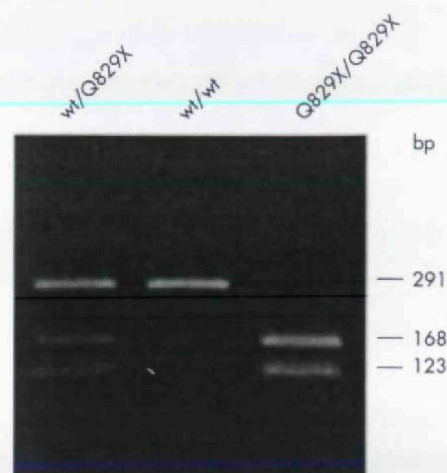


Figure 3 Specific test for the Q829X mutation. *BfaI* digests of exon 22 PCR products from a heterozygote and both types of homozygotes, resolved on a 3% agarose gel. Fragment sizes in base pairs (bp) are indicated on the right.

DISCUSSION

The *OTOF* gene contains 48 exons and encodes multiple long and short isoforms, owing to alternative splicing combined with the use of several translation initiation sites.²⁰ The first 19 exons are exclusive of the long isoforms. The encoded protein, otoferlin, belongs to a family of mammalian proteins sharing homology with *Caenorhabditis elegans* fer-1. The members of this family, which also includes dysferlin and myoferlin, are membrane anchored cytosolic proteins that contain six predicted C2 domains, the last four of which are expected to bind Ca²⁺. The otoferlin long isoforms also have six C2 domains, whereas the short isoforms just contain the last three domains.^{18, 20} Before this report, only four different mutations in *OTOF* have been reported, all of them homozygous in the patients: Y1497X (formerly Y730X, referring to the short isoforms), found in four unrelated, consanguineous families from northern Lebanon¹⁸; IVS24+1G>A (reported as IVS5+1G>A, in reference to the short isoforms) found in a consanguineous Druze family¹⁹; IVS8-2A>G, found in a consanguineous family from India²⁰; and R237X, found in a consanguineous family from the United Arab Emirates.²¹ The first two mutations affect both the long and the short isoforms, the two others affect only the long isoforms. The mutations reported here, Q829X and P1825A, are the first to be found in a western population and in both consanguineous and non-consanguineous families. They affect both the long and the short isoforms. The P1825A mutation is the first missense mutation found in the *OTOF* gene. It alters a conserved proline residue in the sixth C2 domain of the long isoforms (third in the short ones), a domain that is expected to bind Ca²⁺ (fig 1C).²⁰ This mutation appears to be rare in the Spanish population. In contrast, the Q829X mutation is responsible for 12 of 270 cases (4.4%) of recessive (familial or sporadic) prelingual deafness negative for connexin-26 mutations, and about 3% of all cases of recessive prelingual deafness in the Spanish population. This makes Q829X the third most frequent mutation causing recessive deafness in the Spanish population, and suggests a relevant contribution of the *OTOF* gene to prelingual deafness, since other mutations may remain undetected. Consequently, our laboratory has included the detection assay for Q829X in the set of tests routinely performed for the molecular diagnosis of deafness.

Currently, we can provide a molecular genetic diagnosis for about 40% of the Spanish families with recessive deafness who ask for a genetic study. The methodological approach

used in this work has proved to be a useful tool for the discovery of novel, frequent mutations in small families. Its application to other genes for recessive deafness should contribute to finding a selected group of frequent mutations whose routine diagnosis would be quick and easy, allowing us to increase the percentage of diagnosed cases to reach figures comparable to those of other pathologies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first two authors contributed equally to this work. We thank the families and the clinicians who participated in this study and FIAPAS for their enthusiastic support of this research. VM, SM-H, MRB, and MV were recipients of fellowships from 'La Sapienza' University (Roma, Italy), Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, Fundación ONCE, and Comunidad de Madrid, respectively. This work was supported by grants from the European Community (QLG2-CT-1999-00988), CAICYT of Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF99-0025), and Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 00/0244).

Authors' affiliations

V Miglioni*, S Modamio-Heybjør, M A Moreno-Pelayo, M Rodríguez-Ballesteros, M Villamar, D Telleria, F Moreno, I del Castillo, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar km 9, 28034 Madrid, Spain
I Menéndez, Departamento de Genética, Hospital Pediátrico William Soler, San Francisco y Perla, Altahabana, Boyeros, La Habana, Cuba

Correspondence to: Dr I del Castillo, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar, Km 9, 28034 Madrid, Spain; idelcastillo@hrc.insalud.es

* Present address: CSS-Mendel Institute, Viale Regina Margherita 261, 00198 Roma, Italy.

REFERENCES

- Cohen MM, Gorlin RJ. Epidemiology, etiology, and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM, eds. *Hereditary hearing loss and its syndromes*. Oxford: Oxford University Press, 1995:9-21.
- Hereditary Hearing Loss home page (Van Camp G, Smith RJH), <http://www.hia.ac.be/dnalab/hhh>
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998;**62**:792-9.
- Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. *Lancet* 1998;**351**:415.
- Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabédian EN, Petit C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999;**353**:1298-303.
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zocchello F. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 1999;**36**:829-32.
- Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, Arbonés ML, Gasparini P, Estivill X. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26 gene). *Hum Genet* 2000;**106**:40-4.
- Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox U, Gardner MRJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HHM. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet* 2000;**106**:399-405.
- Gabriel H, Kupsch P, Sudendey J, Winterhager E, Jahnke K, Lautermann J. Mutations in the connexin26/GJB2 gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population. *Hum Mutat* 2001;**17**:521-2.
- Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadmann A, Günther B, Menzel HJ, Utermann G, Jancke AR. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur J Hum Genet* 2001;**9**:226-30.
- Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000;**37**:41-3.
- Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Frederici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998;**339**:1500-5.
- Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 1996;**14**:385-91.
- Friedman TB, Liang Y, Weber JL, Hinnant JT, Barber TD, Winata S, Arhya IN, Asher JH. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nat Genet* 1995;**9**:86-91.
- Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJTV, Steel KP, Brown SDM. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997;**16**:188-90.
- Weil D, Küssel P, Blanchard S, Lévy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 1997;**16**:191-3.
- Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S, El-Zir E, Beckmann JS, Loiselet J, Petit C. An α -tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural prelingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet* 1999;**8**:409-12.
- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 1999;**21**:363-9.
- Adato A, Raskin L, Petit C, Bonne-Tamir B. Deafness heterogeneity in a Druze isolate from the Middle East: novel OTOF and PDS mutations, low prevalence of GJB2 35delG mutation and indication for a new DFNB locus. *Eur J Hum Genet* 2000;**8**:437-42.
- Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S, Smith TN, Friedman TB, Lalwani AK, Wilcox ER, Petit C. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *Am J Hum Genet* 2000;**67**:591-600.
- Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailapathy CRS, Wayne S, Bellman S, Desmukh D, Ahmed Z, Khan SN, Der Kaloustian VM, Li XC, Lalwani A, Riazuddin S, Bitner-Glindzicz M, Nance WE, Liu XZ, Wistow G, Smith RJH, Griffith AJ, Wilcox ER, Friedman TB, Morell RJ. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet* 2001;**68**:26-37.
- Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, Shibuya K, Berry A, Chrast R, Guipponi M, Wang J, Kawasaki K, Asakawa S, Minoshima S, Younus F, Mehdi SQ, Radhakrishna U, Pappasavvas MP, Gehrig C, Rossier C, Korostishevsky M, Gal A, Shimizu N, Bonne-Tamir B, Antonarakis SE. Insertion of β -satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet* 2001;**27**:59-63.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 2001;**104**:165-72.
- Dib C, Fauré S, Fizames C, Samsan D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;**380**:152-4.
- Yasunaga S, Petit C. Physical map of the region surrounding the OTOFERLIN locus on chromosome 2p22-p23. *Genomics* 2000;**66**:110-12.
- Keen J, Lester D, Ingelhearn C, Curtis A, Bhattacharya S. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on hydralink gels. *Trends Genet* 1991;**7**:5.
- White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplexes polymorphisms. *Genomics* 1992;**12**:301-6.
- Houseman MJ, Jackson AP, Al-Gazali LI, Badin RA, Roberts E, Mueller RF. A novel mutation in a family with non-syndromic sensorineural hearing loss that disrupts the newly characterised OTOF long isoforms. *J Med Genet* 2001;**38**:e25.

ORIGINAL INVESTIGATION

Silvia Modamio-Højbjør · Miguel Angel Moreno-Pelayo
Angeles Mencía · Ignacio del Castillo
Sebastian Chardenoux · Daniel Armenta · Mark Lathrop
Christine Petit · Felipe Moreno

A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28–29

Received: 16 July 2002 / Accepted: 20 August 2002 / Published online: 16 October 2002

© Springer-Verlag 2002

Abstract Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss (NSSLH) is a genetically highly heterogeneous group of disorders. Autosomal dominant forms account for up to 20% of cases. To date, 39 loci have been identified by linkage analysis of affected families that segregate NSSLH forms in the autosomal dominant mode (DFNA). Investigation of a large Spanish pedigree with autosomal dominant inheritance of bilateral and progressive NSSLH of postlingual onset excluded linkage to known DFNA loci and, in a subsequent genome-wide scan, the disorder locus was mapped to 3q28–29. A maximum two-point LOD score of 4.36 at $\theta=0$ was obtained for marker D3S1601. Haplotype analysis placed the novel locus, DFNA44, within a 3-cM genetic interval defined by markers D3S1314 and D3S2418. Heteroduplex analysis and DNA sequencing of coding regions and exon/intron boundaries of two genes (CLDN16 and FGF12) in this interval did not reveal disease-causing mutations.

Introduction

Hearing loss is the most common sensory defect in humans. About 1/1000 children are affected by severe or pro-

found sensorineural hearing impairment before speech acquisition (prelingual deafness) and genetic causes are estimated to be responsible for up to 60% of these cases (Morton 1991; Marazita et al. 1993). On the other hand, postlingual hearing loss is much more frequent, affecting 10% of the population by age 60 and 50% by age 80, resulting in the progressive social isolation of the affected individual (Petit 1996; Davis 1989). Most cases of postlingual deafness have a multifactorial etiology that results from a combination of genetic and environmental factors but monogenic forms exist that follow a mainly autosomal dominant mode of inheritance, representing about 10–20% of all cases of hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss (NSSLH). Hereditary postlingual hearing loss is usually moderate to severe and progressive and often affects a particular range of frequencies (Bom et al. 1999). So far, more than 70 loci for non syndromic hereditary deafness have been described. Among them, 39 loci (DFNA1–DFNA30, DFNA32–DFNA38, DFNA40 and DFNA41) have been identified in familial cases with autosomal dominant sensorineural hearing loss (ADNSSLH) and 17 genes have been cloned (Van Camp and Smith 2002). In this study, we have identified a novel DFNA locus on chromosome 3q28–29 in a Spanish family with postlingual and progressive hearing loss.

S. Modamio-Højbjør and M. A. Moreno-Pelayo contributed equally to this work and the order of authorship is arbitrary

S. Modamio-Højbjør · M.A. Moreno-Pelayo · A. Mencía
I. del Castillo · F. Moreno (✉)
Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal,
Carretera de Colmenar Km 9, 28034, Madrid, Spain
e-mail: fmoreno@hrc.insalud.es,
Tel.: +34-91-3368541, Fax: +34-91-3369016

S. Chardenoux · C. Petit
Unité de Genétique des Déficiences Sensoriels, CNRS URA 1968,
Institut Pasteur, Paris, France

D. Armenta
Unidad de Genética, Hospital Universitario "Puerta del Mar",
Cadiz, Spain

M. Lathrop
Centre National de Genotypage, Evry, France

Materials and methods

Nomenclature

Gene symbols used in this article follow the recommendations of the HUGO Gene Nomenclature Committee (Povey et al. 2001).

Family data

A five-generation family (S281) with a history of ADNSSLH was ascertained through the Hospital Universitario "Puerta del Mar", Cádiz, in southern Spain. It consists of 40 members, 18 of whom are affected (Fig. 1). Appropriate informed consent was obtained from all study participants. Clinical evaluation was performed and blood samples were collected from 27 family members. DNA was extracted by standard techniques. Environmental factors were ex-

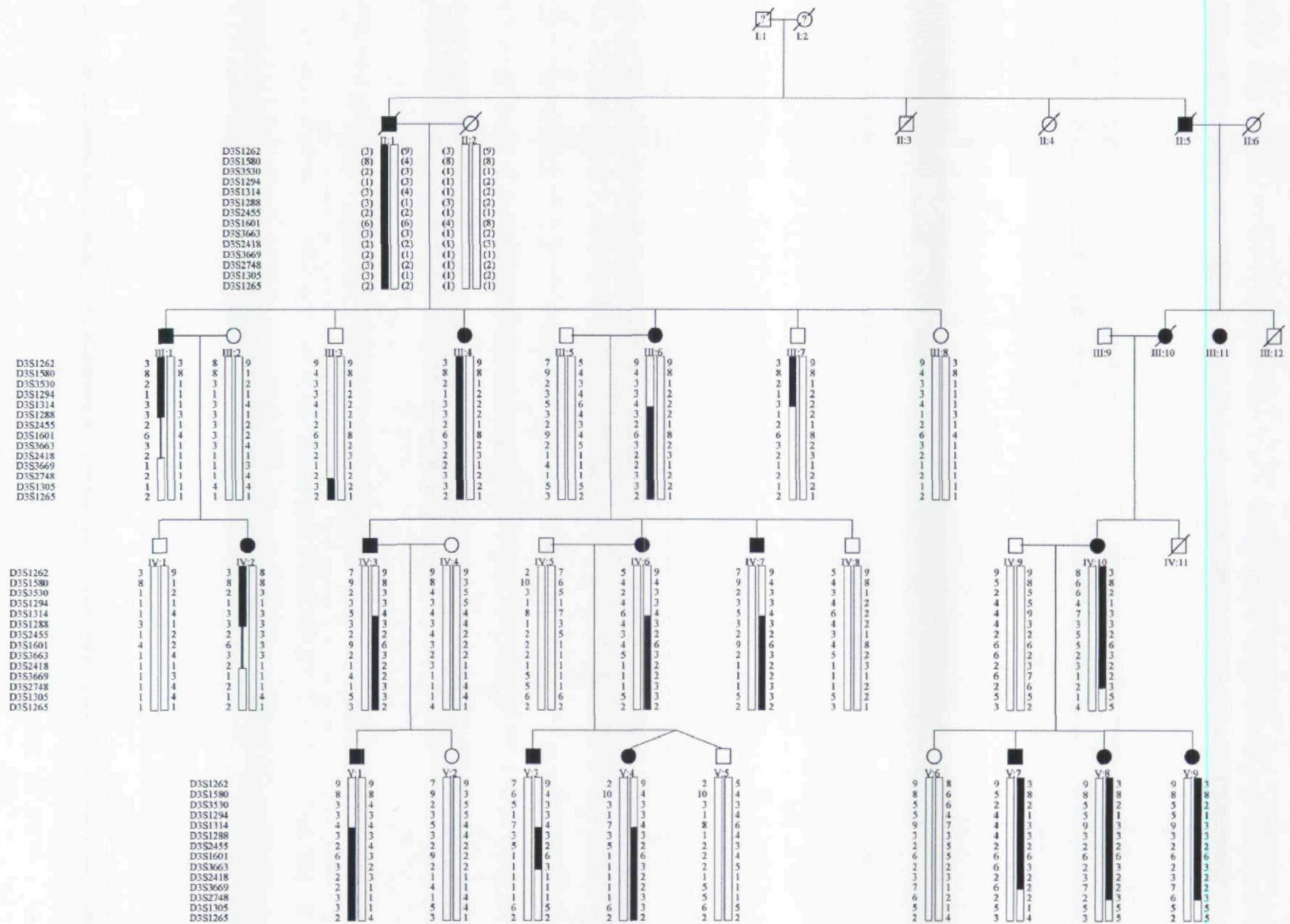


Fig. 1 Pedigree and haplotype analysis of the Spanish family S281. Black symbols represent affected subjects. Haplotypes are represented by bars, with the haplotype associated

with hearing loss in black. A thin line between two segment bars indicates that the marker was not informative for mapping the recombination break point

cluded as the cause of hearing impairment. No syndromic features were present. Otoscopic examination and the use of tuning fork tests ruled out conductive hearing loss. Pure-tone audiometry was performed to test for air conduction (125–8000 Hz) and bone conduction (250–4000 Hz). Previous audiograms from patients were obtained when possible.

Genotyping and linkage analysis

A genome-wide screening was performed with 394 microsatellite markers distributed at intervals of, on average, 10 cM (ABI Prism Linkage Mapping Set 2, Applied Biosystems). Markers for the exclusion of all known DFNA loci and for the refinement of the critical interval were taken from the Génethon human linkage map (Dib et al. 1996) and from the Marshfield chromosome 3 map (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics>). The order of the markers was established by integrating genetic and physical maps (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Fluorescently labelled alleles were analysed in an ABI PRISM 310 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Linkage analysis was performed by using the LINKAGE 5.1 software package (Lathrop et al. 1985). Two-point LOD scores between the deafness locus and each marker were calculated under a fully penetrant autosomal dominant mode of inheritance, setting the disease allele frequency to 0.00001 and considering marker allele frequencies as being equal to each other.

Candidate gene analysis

Primers were designed for the amplification of coding regions and exon-intron boundaries of CLDN16 (MIM 603959) and FGF12 (MIM 601513). Polymerase chain reaction (PCR) was performed by standard procedures as previously described (del Castillo et al. 2002). Heteroduplex analysis was carried out in MDE gels (BioWhittaker, Rockland, Me.) according to manufacturer's protocol. Sequences of PCR products were analysed in an automated DNA sequencer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Results and discussion

Clinical features

Affected subjects show bilateral, symmetrical and progressive sensorineural hearing impairment. Initially, the hearing loss in this family is moderate, mainly affecting low-mid frequencies (125–2000 Hz); it later progresses, involving all the frequencies (flat audiometric profile), to a profound hearing loss in the sixth decade (Fig. 2A). Linear regression analysis, based on all available audiograms from affected subjects, showed a 1.1 dB/year age-linked progression of the 125–8000 Hz average hearing loss (Fig. 2B). The onset of hearing loss was reported to occur in the first decade of life (6–10 years of age) in affected members of the family. No evidence of either vestibular dysfunction or occasional tinnitus was reported in affected subjects of the family. Computer tomography scan analysis of affected member III:1 ruled out inner ear malformations.

Linkage analysis

Twenty-six members of the family were considered informative for linkage. Subject V:2 is only 6 years old, below

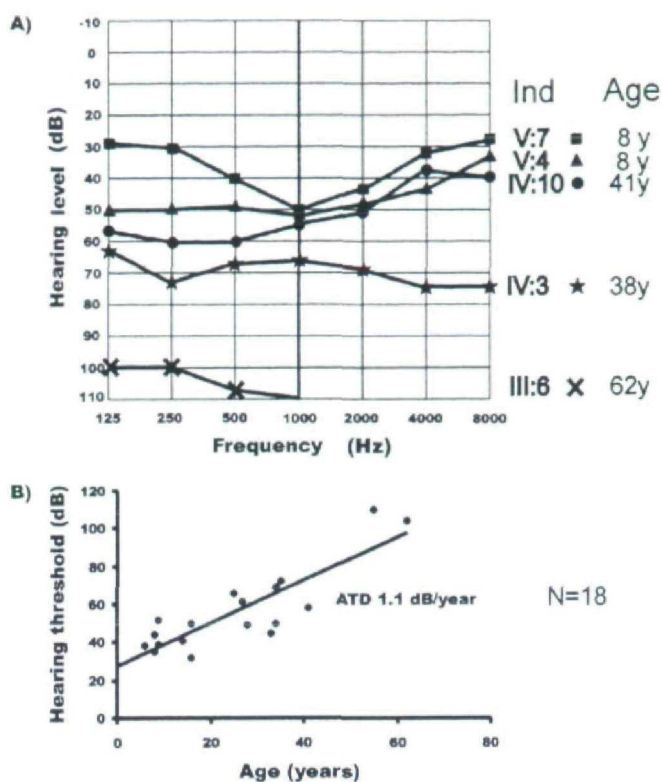


Fig. 2 **A** Audiograms showing the air conduction values obtained from five different affected subjects. Each graph point represents the average hearing loss for the right and left ears. Younger members show decreased hearing particularly at low-mid frequencies, whereas older subjects present a flat audiometric profile. **B** Plot depicting average hearing loss values (obtained from all available audiograms) versus age. Progression of the hearing loss was calculated by linear regression and expressed as annual threshold deterioration of all frequencies in dB per year (ATD)

the age of onset, and therefore she was not included in the linkage analysis.

Initially, we tested the family for linkage to all described loci responsible for ADNSSL. In all cases, negative results were obtained indicating the involvement of a novel locus responsible for the hearing loss in this family. Therefore, a genome-wide scan was performed with a set of 394 microsatellite markers, with an average spacing of 10 cM. Evidence of linkage was found to marker D3S1601 (maximum two-point LOD score of 4.36 at $\theta=0.000$) in chromosomal region 3q28–29. The family was then genotyped for additional markers flanking D3S1601 in order to confirm linkage and for fine mapping of the genetic interval, resulting in significant LOD scores at $\theta=0$ for markers D3S1288, D3S2455 and D3S3663 (Table 1). Extensive alterations of the disease gene frequency or the allele frequencies of microsatellite markers did not change the conclusions of the analysis. The position of the novel deafness locus, DFNA44, was delimited by haplotype analysis. This analysis revealed two key recombination events between D3S1314 and D3S1288 in individuals III:6 and III:7 on the centromeric side locating DFNA44 telomeric to marker D3S1314, and a crossover between D3S3663 and

Table 1 Two point Lod Scores between 3q28 microsatellite markers and DFNA44

Marker	Recombination fractions (θ):							Z_{\max}	θ_{\max}
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40		
D3S1262	$-\infty$	1.49	1.94	1.94	1.60	1.11	0.55	1.97	0.07
D3S1580	$-\infty$	-1.68	0.14	0.69	0.87	0.65	0.32	0.88	0.18
D3S3530	$-\infty$	-0.18	1.55	1.98	1.88	1.34	0.61	2.03	0.13
D3S1294	$-\infty$	0.81	1.88	2.06	1.77	1.18	0.52	2.06	0.10
D3S1314	$-\infty$	1.96	2.98	3.08	2.61	1.81	0.85	3.09	0.09
D3S1288	3.82	3.75	3.46	3.09	2.30	1.45	0.56	3.82	0.00
D3S2455	3.94	3.87	3.59	3.22	2.47	1.65	0.77	3.94	0.00
D3S1601	4.36	4.28	3.98	3.59	2.77	1.89	0.92	4.36	0.00
D3S3663	4.20	4.13	3.83	3.44	2.63	1.76	0.80	4.20	0.00
D3S2418	$-\infty$	1.38	1.84	1.84	1.51	1.02	0.45	1.87	0.07
D3S3669	$-\infty$	1.06	2.11	2.26	1.90	1.21	0.43	2.27	0.09
D3S2748	$-\infty$	-0.31	1.42	1.85	1.75	1.21	0.51	1.90	0.13
D3S1305	$-\infty$	-5.06	-1.85	-0.70	0.08	0.23	0.14	0.23	0.30
D3S1265	$-\infty$	-0.73	0.46	0.79	0.84	0.60	0.25	0.87	0.16

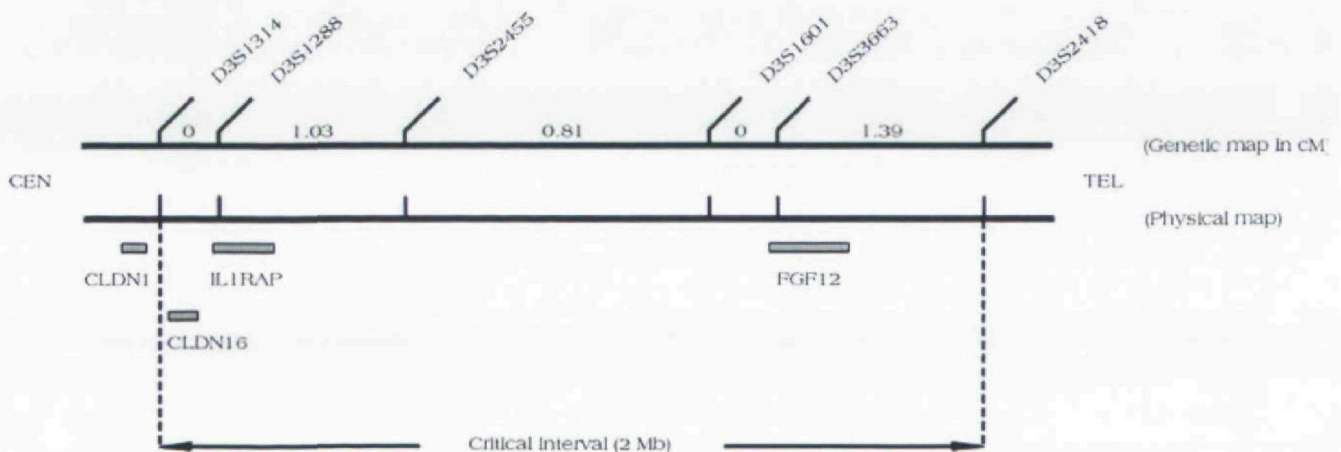
D3S2418 in individual V:3, on the telomeric side, mapping DFNA44 centromeric to D3S2418. Thus, DFNA44 lies within a critical interval of about 3 cM between marker D3S1314 on the proximal side and D3S2418 on the distal side (Fig. 1).

Candidate gene analysis

The DFNA44 critical interval established above spans a physical distance of about 2 Mb. Few known genes (*CLDN16*, *IL1RAP* and *FGF12*) have so far been identified in this interval (Fig. 3). No genes for syndromes involving hearing impairment have been mapped to this chromosome 3 region. The human chromosome region containing DFNA44 shares conserved synteny with a fragment of mouse chromosome 16 but no mutation causing hearing

impairment in mouse mutants has been mapped to this region. Based on a candidate gene approach, *CLDN16* (MIM603959) and *FGF12* (MIM601513) were selected to be studied. The first gene, *CLDN16*, that codes for the tight junction protein claudin-16 (Simon et al. 1999) was considered a putative candidate since: (1) another claudin family member, claudin-14, is responsible for a recessive form of deafness, *DFNB29* (Wilcox et al. 2001) and (2) tight junctions play a major role in the cochlea, compartmentalising endolymph and providing structural support for the auditory neuroepithelium (Furuse et al. 1998). Heteroduplex and sequence analysis of the five exons from *CLDN16* only revealed an insertion/deletion mutation (165_166delGGinsC). This frameshift mutation would generate a premature TGA stop codon in exon 1. This change was detected in heterozygosity only in one affected subject, III:1, and in two normally hearing members, III:8 and IV:1, and so it was not considered to be responsible for the hearing loss, as it did not segregate with the disorder in this family. This complex mutation had been first reported in homozygosity in recessive forms of familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis resulting in renal failure (Weber et al. 2000). In the present family

Fig. 3 Physical and genetic maps of the DFNA44 critical interval. *CEN* centromere, *TEL* telomere, *CLDN1* claudin 1 (MIM 603718), *CLDN16* claudin 16 (MIM 603959), *IL1RAP* interleukin 1 receptor associated protein (MIM 602626), *FGF12* fibroblast growth factor 12 (MIM 601513)



no signs of kidney disease have been reported, so the subjects III:1, III:8 and IV:1 seem to be just coincidental carriers of this mutation.

FGF12 (also known as FHF-1) is a fibroblast growth factor (FGF) homologue involved in nervous system development (Smallwood et al. 1996). Although its expression in the inner ear has not been reported so far, several FGF family members have major roles at different stages in inner ear development (Pickles et al. 2002), thus making FGF12 a candidate. FGF12 is encoded by five exons. Two FGF12 human isoforms have been described, which are generated through the use of two alternative transcription start sites (Muñoz-Sanjuan et al. 2000). Heteroduplex and sequence analysis of both isoforms did not reveal the disease-causing mutation.

Additionally, in order to find further putative candidates in the critical interval, inner ear expressed sequence tags (ESTs) were sought in the Morton Cochlear EST Database (<http://hearing.bwh.harvard.edu/cochlearcdnalibrary.htm>). Subsequent BLAST analysis rendered no matches within the DFNA44 interval. The critical interval also contains several poorly characterised genetic locations (LOC), with hypothetical homology to known genes, and several predicted genes of unknown function (NCBI resources), so progress in identifying the DFNA44 gene will depend on the isolation of candidate cDNAs from the critical interval.

The addition of this novel locus responsible for autosomal dominant hearing impairment to the broad catalogue of previously described loci supports the vast genetic heterogeneity underlying this disorder. The recombination events in this family have allowed us to narrow the critical interval to 3 cM, which should facilitate the identification of the responsible gene. It should also contribute further to our understanding of the inner ear.

Acknowledgements We are grateful to the Spanish family who made this research possible. This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS-96/1556; the Comisión de Investigación de Ciencia y Tecnología CICYT-SAF 99-0025 and the European Community QLG2-CT-1999-0098.

References

- Bom SJ, Kunst HP, Huygen PL, Cremers FP, Cremers CW (1999) Non-syndromal autosomal dominant hearing impairment: ongoing phenotypical characterization of genotypes. *Br J Audiol* 33:335-348
- del Castillo J, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F (2002) A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346:243-249
- Davis AC (1989) The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol* 18:911-917
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Milasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 380:152-154
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1985) Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 37:482-498
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE (1993) Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 46:486-491
- Morton NE (1991) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 630:16-31
- Muñoz-Sanjuan I, Smallwood PM, Nathans J (2000) Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J Biol Chem* 275:2589-2597
- Petit C (1996) Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 14:385-391
- Pickles JO, Chir B (2002) Roles of fibroblast growth factors in the inner ear. *Audiol Neurotol* 21:36-39
- Povey S, Lovering R, Bruford E, Wright M, Lush M, Wain H (2001) The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). *Hum Genet* 109:678-680
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 285:103-106
- Smallwood PM, Muñoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SH, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J (1996) Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9850-9857
- Van Camp G, Smith RJH (2002) Hereditary hearing loss homepage. <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>
- Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwert-Broeking E, Meij IL, Knoers NV, Cochat P, Sulakova T, Bonzel KE, Soergel M, Manz F, Schaerer K, Seyberth HW, Reis A, Konrad M (2000) Familial hypomagnesaemia with hypercalcaemia and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet* 8:414-422
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104:165-172

LETTER TO JMG

DFNA49, a novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23

M A Moreno-Pelayo*, S Modamio-Høybjør*, A Mencía, I del Castillo, S Chardenoux, M Fernández-Burriel, M Lathrop, C Petit, F Moreno

J Med Genet 2003;40:832–836

Approximately 1 in 1000 children is born with a serious permanent hearing impairment (pre-lingual deafness), and it is estimated that more than half of these cases in developed countries are due to genetic factors.^{1–3} The prevalence of hearing loss increases dramatically with age; it is estimated that approximately 5% of people under 45 years of age have a significant loss of hearing, increasing to approximately 50% by 80 years of age.⁴ Age related late onset hearing loss (presbycusis) is a heterogeneous trait with many suspected causes.⁴ Genetic or environmental factors such as diabetes, mitochondrial mutations, or environmental noise exposure may contribute to the trait. In addition, hearing loss beginning at late childhood, youth, or later, clearly segregates as a monogenic autosomal dominant Mendelian trait in many families. The hearing loss phenotype in these families is usually non-syndromic—that is, the hearing loss is not associated with other anomalies, and it accounts for up to 20% of the cases of non-syndromic sensorineural inherited deafness. This type of hearing loss is usually progressive, affecting a particular range of frequencies in each case.⁵ To date, 36 loci for autosomal dominant non-syndromic sensorineural hearing loss (ADNSSL) have been mapped, and 17 deafness genes from these loci have been identified.⁶ These genes encode a wide variety of proteins; some have known function but for most, the underlying mechanisms leading to hearing impairment are uncertain. Given the few described mouse models for progressive hearing loss,⁷ our current understanding of post-lingual and progressive deafness relies on the identification of genes through human mapping studies. In this work we describe the mapping of a novel DFNA locus on chromosome 1q21–q23 segregating in a Spanish family with post-lingual and progressive hearing loss.

PATIENTS AND METHODS

Family data

We ascertained a four generation family (S277) segregating ADNSSL, through the Hospital Universitario Materno Infantil. The pedigree consists of 31 members, fourteen of them affected (fig 1). Informed consent was obtained from all study participants and from parents of subjects younger than 18 years. Clinical history interview and physical examination of members of this family ruled out environmental factors as the cause of the hearing loss. Peripheral blood samples were collected from 27 family members and DNA extraction was performed following standard methods. Tympanometry indicated proper functioning of the middle ear, and acoustic reflex thresholds showed the presence of recruitment in affected subjects. Clinical and instrumental evaluation did not reveal any evidence of syndromic features. Pure tone audiometry was performed to test for air conduction (125–8000 Hz) and bone conduction (250–4000 Hz).

Key points

- Autosomal dominant inheritance accounts for about 20% of the cases of hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss (NSSL)—that is, hearing loss not associated with other clinical features. So far, 36 loci have been mapped in familial cases that segregate autosomal dominant NSSL (DFNA), and 17 genes have been identified.
- Here we report the location of a novel autosomal dominant deafness locus on 1q21–q23, DFNA49, found by studying a large Spanish family with non-syndromic, progressive mid-frequency hearing loss of post-lingual onset. A maximum lod score of 6.02 at $\theta=0$ was obtained for markers D1S3784 and D1S3785. Analysis of recombinant haplotypes placed the deafness locus within a 4 cM region defined by markers GDB:190880 and D1S3786.
- This genetic interval is proximal to and does not overlap with the previously identified loci, DFNA7 and DFNM1, on 1q21–q23.
- Screening of candidate genes within the DFNA49 interval (*KCNJ9*, *KCNJ10*, *ATP1A2* and *CASQ1*) did not reveal the mutation causing this deafness.

Where possible, results from previous audiological tests were collected.

Genotyping and linkage analysis

A wide genome scan was performed with 394 microsatellite markers distributed with an average spacing of 10 cM (ABI Prism Linkage Mapping Set 2; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Markers for the exclusion of all known DFNA loci and for fine mapping of the critical interval were taken from the Génethon human linkage map⁸ and from the Marshfield chromosome 1 map (<http://research.marshfield-clinic.org/genetics>). Additional short tandem repeats (STRs) in the DFNA49 region were identified by inspection of publicly available sequence data (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Flanking primers were designed for polymerase chain reaction (PCR) amplification of these

Abbreviations: ADNSSL, autosomal dominant non-syndromic sensorineural hearing loss; NSSL, non-syndromic sensorineural hearing loss; PCR, polymerase chain reaction; STRs, short tandem repeats

STRs. The amplicons were confirmed to be polymorphic microsatellite markers and deposited into the GDB database (<http://www.gdb.org>), being assigned the following D numbers: D1S3780 (GDB: 11511382), D1S3783 (GDB: 11511388), D1S3784 (GDB: 11511390), D1S3785 (GDB: 11511392), and D1S3786 (GDB: 11511394). The order of markers used in this work was established by integrating genetic and physical maps (NCBI).

Fluorescently labelled alleles were analysed in an ABI Prism 310 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Linkage analysis was performed using the Linkage 5.1 software package.⁹ Two point lod scores between the deafness locus and each marker were calculated under a fully penetrant autosomal dominant mode of inheritance, setting the disease allele frequency to 0.00001 and considering marker allele frequencies to be equal to each other.

DNA sequencing analysis

Four candidate genes, *KCNJ9* (MIM600932), *KCNJ10* (MIM602208), *ATP1A2* (MIM182340) and *CASQ1* (MIM114250) in the DFNA49 interval were screened by heteroduplex analysis and direct sequencing of PCR products generated from genomic DNA of affected subjects. Primers were designed to amplify each exon and adjacent intron-exon boundaries. PCR was performed by standard procedures as previously described.¹⁰ Heteroduplex analysis was carried out in mutation detection enhancement gels (BioWhittaker, Rockland, ME, USA) according to the manufacturer's protocol. Sequences of PCR products were analysed in an automated DNA sequencer (ABI Prism 310; Applied Biosystems).

RESULTS AND DISCUSSION

Clinical features

Affected subjects of the family present a symmetrical, bilateral, and progressive nonsyndromic sensorineural hearing loss. The hearing loss appears in the first decade of life in affected members. The earliest clinical evidence of hearing loss in the family was obtained from individual III:12 at the age of 8 years. Initially, the hearing loss in this family is moderate for low and mid frequencies and mild for high frequencies (4000–8000 Hz), so the affected members show in this stage a gently upsloping audiometric profile. Later, it progresses to moderate in the 125–250 Hz and 4000–8000 Hz ranges and to severe in the 500–2000 Hz range (U shaped audiometric profile) in the fourth decade. Linear regression analysis, based on all available audiograms from affected subjects, showed a 0.7 dB/year age linked progression of the hearing loss at all frequencies. Affected subjects of the family did not exhibit either tinnitus or clinical features suggestive of vestibular dysfunction.

Linkage analysis

Linkage to previously published loci responsible for autosomal dominant deafness (DFNA) was investigated in a core pedigree of 26 persons (subject IV:3 is 20 months old, clearly below the age of deafness onset, and therefore he was not included in the linkage analysis) obtaining negative results. A wide genome search was then performed to map the deafness locus, using a set of 394 microsatellite markers with an average spacing of 10 cM. Interestingly, the two point lod scores obtained for markers D1S498 (3.01 at $\theta = 0$) and D1S484 (3.72 at $\theta = 0.05$) on chromosome 1q21–q23

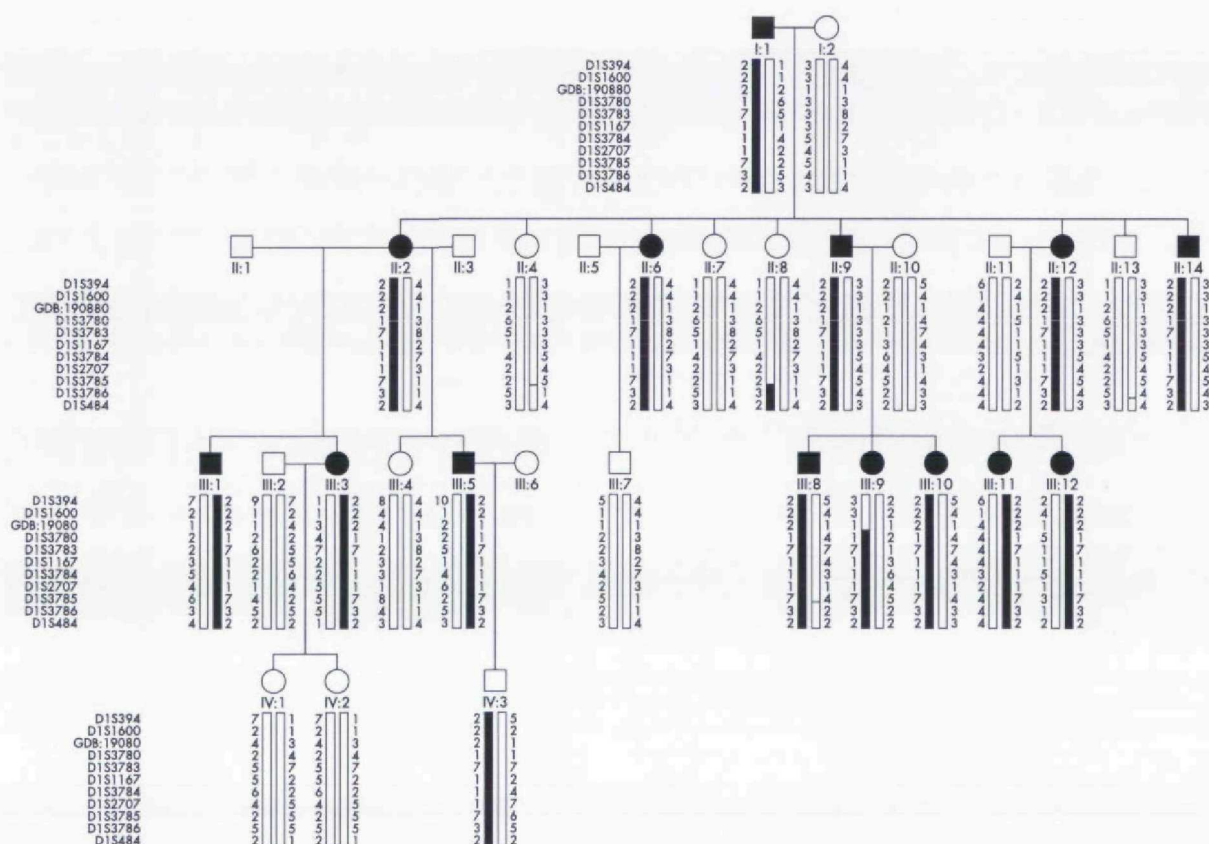


Figure 1 Pedigree and haplotype analysis of the Spanish family S277. Black symbols represent affected subjects. Haplotypes are represented by bars, with the haplotype associated with hearing loss in black. At the time of the study affected subjects III:12, III:11, III:10, III:9 and III:8 were 8, 14, 15, 17 and 18 years old respectively.

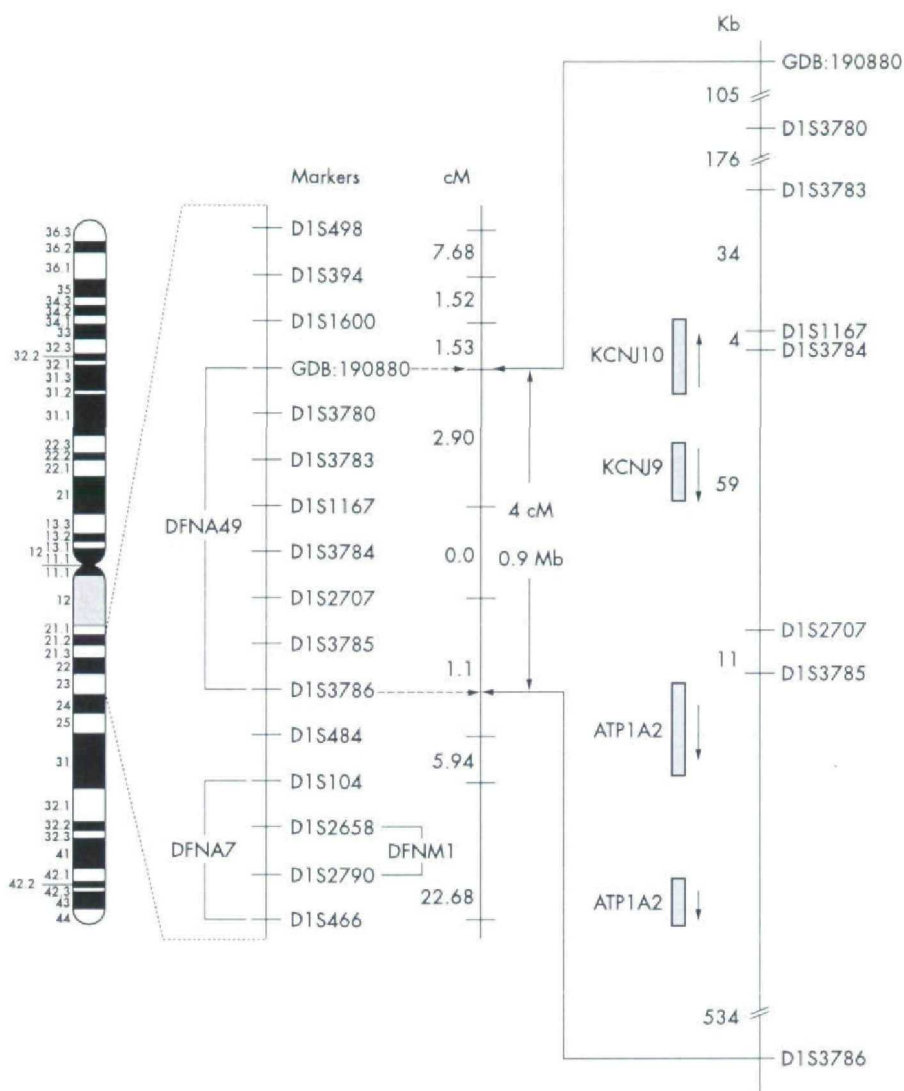


Figure 2 Physical and genetic maps of the chromosome 1q21-q23 region showing the localisation of DFNA49 and DFNA7/DFNM1 critical intervals. cM, centimorgan; kb, kilobase. *KCNJ9* (OMIM #600932); *KCNJ10* (OMIM #602208); *ATP1A2* (OMIM #182340) and *CASQ1* (OMIM #114250). For clarity, the genetic and physical distances are not represented to scale.

were suggestive of linkage to this region (fig 2). We then tested additional markers spanning this region, and evidence of linkage to markers D1S3780, D1S3783, D1S1167, and D1S2707 was found, with maximum two point lod scores of 6.02 at $\theta = 0$ for markers D1S3784 and D1S3785 (table 1). Extensive alterations of the disease gene frequency or the allele frequencies of microsatellite markers did not change the conclusions of the analysis. The inspection of recombinant haplotypes in subjects III:9 and II:8 placed the hearing loss locus between the proximal marker GDB: 190880 and the distal one D1S3786, which define a critical interval of about 4 cM for the novel locus, DFNA49 (fig 1 and 2). All the patients in the family share the same disease haplotype, which is also carried by the 20 month old child IV:3. Periodic audiometric examination of this subject will be performed to precisely determine when the hearing impairment begins in this family.

Another dominant locus for hearing loss (DFNA7) was mapped to a 22 cM region on 1q21-q23 between D1S104 and D1S466 in a Norwegian family¹¹ (fig 2). The DFNA7 interval has been reported to include the DFNM1 locus, a dominant modifier that suppresses the DFNB26 phenotype.¹² The

DFNA7/DFNM1 region had previously been excluded for linkage in our family. As shown in fig 2, a genetic distance of 6 cM separates this interval and the one defined for DFNA49. It should also be noted that the audiometric response associated with DFNA7 and DFNA49 in the reported families is clearly different. DFNA7 patients show a sharply sloping audiogram affecting the high frequencies, instead of the U shaped audiometric pattern found in the DFNA49 affected subjects.

Candidate gene analysis

No genes for syndromic deafness have been mapped to DFNA49 critical interval. This interval spans 0.9 Mb and includes 23 known genes and several predicted or poorly characterised genes according to the annotation in the NCBI database. Of these, we selected *ATP1A2*, *CASQ1*, *KCNJ10* and *KCNJ9* for screening of mutations (fig 2).

ATP1A2 consists of 23 exons¹³ and encodes the NaK-ATPase $\alpha 2$ subunit, which is responsible for the catalytic activity of the enzyme. In mouse cochlea, the $\alpha 2$ isoform is expressed in the spiral structures: ligament, limbus, and ganglion¹⁴, where it is believed to play an important role in the development

Table 1 Two point lod scores between 1q microsatellite markers and DFNA49

Marker	Recombination fractions (θ)							Z_{\max}	θ_{\max}
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40		
D1S394	-∞	3.93	4.27	4.11	3.38	2.40	1.20	4.27	0.05
D1S1600	-∞	3.34	3.72	3.59	2.98	2.11	1.04	3.72	0.05
GDB:190880	-∞	0.97	1.51	1.60	1.44	1.09	0.62	1.60	0.10
D1S3780	5.72	5.63	5.27	4.80	3.78	2.62	1.29	5.72	0.00
D1S3783	5.42	5.34	5.00	4.55	3.58	2.48	1.21	5.42	0.00
D1S1167	3.31	3.26	3.04	2.76	2.16	1.49	0.76	3.31	0.00
D1S3784	6.02	5.93	5.55	5.06	3.99	2.77	1.37	6.02	0.00
D1S2707	5.42	5.34	5.00	4.55	3.58	2.48	1.21	5.42	0.00
D1S3785	6.02	5.93	5.55	5.06	3.99	2.77	1.37	6.02	0.00
D1S3786	-∞	3.93	4.27	4.11	3.38	2.40	1.21	4.27	0.05
D1S484	-∞	3.34	3.72	3.59	2.98	2.11	1.05	3.72	0.05

and maintenance of the fluid and electrolyte balance. *CASQ1* has 11 exons¹⁵ and codes for calsequestrin, a calcium binding protein found in the cytoplasm of outer hair cells where it is thought to store and release calcium from membrane bound intracellular storage sites.¹⁶ Calcium is believed to play a major signalling role in outer hair cells by controlling metabolism, cytoskeletal integrity, cell shape, and cell excitability. *KCNJ10* consists of two exons¹⁷ and encodes an inwardly rectifying K⁺ channel subunit that is strongly expressed in the cochlear stria vascularis, where it is crucially involved in the generation of the endocochlear potential,^{18, 19} and in the satellite cells that surround the neurones and axons of the cochlear and vestibular ganglia.²⁰ Knockout mice for *KCNJ10* present a profound deafness and severe structural degeneration of the cochlea.^{21, 22} *KCNJ9* has three exons²³ and codes for a K⁺ channel with structural and functional similarity to *KCNJ10*,²⁴ although its expression has not been reported in the inner ear so far.

The exons and flanking regions of the four genes were investigated by heteroduplex and DNA sequencing in two affected subjects (I:1 and II:2). These analysis only revealed the non-pathogenic polymorphisms, 1097T→C in exon 3 of *KCNJ9* (NCBI SNP cluster id: rs3001040) and the IVS1-84T→C intronic change in *KCNJ10*, which was present in several control individuals with normal hearing. This last polymorphism allowed us to verify the presence in affected subjects of the two intact copies of *KCNJ10* exon 2, which include the entire coding region, so excluding the deletion of, or insertions in, this exon as the cause of deafness (data not shown).

Reports of more families with hearing deficit linked to DFNA49 may enable a further refinement of the critical interval facilitating the identification of the responsible gene. We are now searching for novel candidate genes at the DFNA49 interval.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Spanish family who made this research possible. This work was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología CICYT-SAF 99-0025, the Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF 2002-03966, and the European Community QL62-CT-1999-0098. S Modamio-Højbjør, and A Mencía are Fellows, respectively, of the Ministerio de Ciencia y Tecnología and Fondo de Investigaciones Sanitarias.

Authors' affiliations

M Angel Moreno-Pelayo, S Modamio-Højbjør, A Mencía, I del Castillo, F Moreno, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

S Chardenoux, C Petit, Unité de Génétique des Déficiences Sensorielles, CNRS URA 1968, Institut Pasteur, Paris, France

M Fernández-Burriel, Laboratorio de Genética Molecular, Hospital Universitario Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain
M Lathrop, Centre National de Génotypage, Evry, France

*The first two authors contributed equally to this work and the order of authorship is arbitrary.

Correspondence to: Dr F Moreno, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km 9, 28034, Madrid, Spain; fmoreno.hrc@salud.madrid.org

REFERENCES

- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 1991;630:16-31.
- Reardon W. Genetic deafness. *J Med Genet* 1992;29:521-6.
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 1993;46:486-91.
- Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:1-16.
- Bom SJ, Kunst HP, Huygen PL, Cremers FP, Cremers CW. Non-syndromal autosomal dominant hearing impairment: ongoing phenotypic characterization of genotypes. *Br J Audiol* 1999;33:335-48.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss 2003. <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>.
- Vreugde S, Erven A, Kros CJ, Marcotti W, Fuchs H, Kurima K, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ, Balling R, Hrabec De Angelis M, Avraham KB, Steel KP, Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nat Genet* 2002;30:257-8.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152-4.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 1985;37:482-98.
- Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menéndez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002;346:243-9.
- Fagerheim T, Nilssen, Raeymaekers P, Brox V, Moum T, Elverland HH, Teig E, Omland HH, Fostad GK, Tranebjærg L. Identification of a new locus for autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA7) in a large Norwegian family. *Hum Mol Genet* 1996;5:1187-91.
- Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, Lalwani AK, Mastroianni MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ, Riazuddin S, Wilcox ER. Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet* 2000;26:431-4.
- Shull MM, Pugh DG, Lingrel JB. Characterization of the human Na,K-ATPase alpha 2 gene and identification of intragenic restriction fragment length polymorphisms. *J Biol Chem* 1989;264:17532-43.
- Erichsen S, Zuo J, Curtis L, Rarey K, Hultcrantz M. Na,K-ATPase α - and β -isoforms in the developing cochlea of the mouse. *Hear Res* 1996;100:143-9.
- Fujii J, Willard HF, MacLennan DH. Characterization and localization to human chromosome 1 of human fast-twitch skeletal muscle calsequestrin gene. *Somat Cell Mol Genet* 1990;16:185-9.
- Slepecky NB, Ulfendahl M. Evidence for calcium-binding proteins and calcium-dependent regulatory proteins in sensory cells of the organ of Corti. *Hear Res* 1993;70:73-84.
- Shuck ME, Piser TM, Bock JH, Slightom JL, Lee KS, Bienkowski MJ. Cloning and characterization of two K⁺ inward rectifier (Kir) 1.1 potassium channel homologs from human kidney (Kir1.2 and Kir1.3). *J Biol Chem* 1997;272:586-93.
- Hibino H, Horio Y, Inanobe A, Doi K, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kawamura M, Kubo T, Kurachi Y. An ATP-dependent inwardly

- rectifying potassium channel, KAB-2 (Kir4.1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with the formation of endocochlear potential. *J Neurosci* 1997;17:4711-21.
- 19 Ando M, Takeuchi S. Immunological identification of an inward rectifier K⁺ channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res* 1999;298:179-83.
 - 20 Hibino H, Horio Y, Fujita A, Inanobe A, Doi K, Gotow T, Uchiyama Y, Kubo T, Kurachi Y. Expression of an inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in satellite cells of rat cochlear ganglia. *Am J Physiol* 1999;277:C638-44.
 - 21 Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Cell Physiol* 2002;282:C403-7.
 - 22 Rozengurt N, Lopez I, Chiu CS, Kofuji P, Lester HA, Neusch C. Time course of inner ear degeneration and deafness in mice lacking the Kir4.1 potassium channel subunit. *Hearing Res* 2003;177:71-80.
 - 23 Vaughn J, Walford JK, Prochazka M, Permana PA. Genomic structure and expression of human KCNJ9 (Kir3.3/GIRK3). *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:302-9.
 - 24 Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channel and hereditary disease. *Physiol Rev* 1999;79:1317-72.

ECHO

Susceptibility to Crohn's disease may lurk in enzyme mutation



Please visit the Journal of Medical Genetics website (www.jmedgenet.com) for a link to the full text of this article.

A preliminary study of genetic polymorphisms affecting transforming enzymes in the gut has singled out for the first time microsomal epoxide hydrolase as a likely candidate for susceptibility to Crohn's disease (CD).

Homozygous Tyr 113 substitution for His 113 in exon 3 of the microsomal epoxide hydrolase (*EPXH*) gene was the only one of seven variants in a series of genes coding for detoxifying enzymes with a significantly higher frequency in patients with CD than controls (47% v 21%, respectively). Tyr/Tyr genotype was also more common within the patient group than in the control group (allele frequency 0.67 v 0.61, respectively), and the odds of having the Tyr 113 allele were almost three times higher. This variant and another, in exon 4 of the same gene, were not associated with disease site, disease onset, fistulas, or history of bowel resection.

The variants were identified by PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). They included those in cytochrome *P-450* 1A1C (*CYP1A1* 3' flanking region, *CYP1A1* exon 7); glutathione S-transferases mu-1, pi-1, and theta-1 (*GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*); and epoxide hydrolases (*EPXH*) in exons 3 and 4. Screening was performed on 151 consecutive outpatients at a hospital clinic in the Netherlands and age and sex matched healthy controls; all were Caucasian.

Reactive oxygen species and their toxic metabolites have been implicated in inflammation of the gut in CD. Detoxifying enzymes, such as glutathione S-transferases and epoxide hydrolases, may also have a role, so polymorphisms affecting their activity may affect risk of developing CD.

▲ *Gut* 2003;52:547-551.

ELECTRONIC LETTER

A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci

S Modamio-Høybjør, M A Moreno-Pelayo, A Mencía, I del Castillo, S Chardenoux, D Morais, M Lathrop, C Petit, F Moreno

J Med Genet 2004;41:e14 (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/41/2/e14>). doi: 10.1136/jmg.2003.012500

Progressive hearing loss is a significant problem in all ageing populations. By the age of 80 years, nearly 50% of individuals have hearing loss that impairs their ability to communicate easily, leading to increasing social isolation.¹ Progressive hearing loss in middle and late adulthood is considered multifactorial, with involvement of both genetic and environmental factors.² In contrast, childhood or adolescent hearing loss is often inherited as an autosomal dominant Mendelian trait, representing about 20% of all cases of hereditary nonsyndromic sensorineural hearing impairment (NSSHI). Postlingual inherited deafness is usually moderate to severe and progressive, and it often affects a particular range of frequencies.³

Hereditary deafness has proved extremely heterogeneous genetically; more than 40 loci have been mapped for autosomal dominant (AD) NSSHI, and 17 deafness genes from these loci have been identified to date.⁴ Linkage analysis using large pedigrees is a useful tool for mapping and identifying novel deafness genes, a key step for improving our current understanding of auditory function. Here we describe the localisation of a novel DFNA locus on chromosome 7q32, involving the study of a Spanish family with postlingual and progressive hearing loss affecting all frequencies.

PATIENTS AND METHODS

Family data

A five generation family (S403) with a history of ADNSSH was identified through the Hospital Universitario de Valladolid, Spain. The pedigree consisted of 74 members, 37 of whom were affected (fig 1). Appropriate informed consent was obtained from all participants of the study and from parents of subjects younger than 18 years. Clinical evaluation was carried out, blood samples were collected from 55 family members, and DNA was extracted by standard techniques. Environmental factors were excluded as causes of hearing impairment. No syndromic features were present. Tympanometry with acoustic reflex testing indicated proper functioning of the middle ear, and pure tone audiometry was performed to test for air conduction (250–8000 Hz) and bone conduction (250–4000 Hz). Previous audiograms were obtained where possible.

Genotyping and linkage analysis

A genome wide screening was performed with 394 microsatellite markers distributed with an average spacing of 10 cM (ABI Prism Linkage Mapping Set 2, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Markers for the exclusion of all known DFNA loci and for fine mapping of the critical interval were taken from the Génethon human linkage map⁵ and from the Marshfield chromosome 7 map (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics>). An additional short tandem repeat (STR) in the DFNA50 critical interval was identified by

Key Points

- Nonsyndromic sensorineural hearing impairment (NSSHI) is the most common form of genetic deafness. Approximately 20% of cases segregate as autosomal dominant (AD) traits, for which about 40 DFNA loci have been mapped and 17 genes have been identified, making ADNSSH an extremely heterogeneous disorder.
- In this study, we report the mapping of a novel autosomal dominant deafness locus on 7q32, DFNA50, by studying a large multigenerational Spanish family segregating postlingual and progressive ADNSSH affecting all frequencies. A maximum LOD score of 10.66 at $\theta = 0$ was obtained for marker D7S530. The analysis of recombinant haplotypes located DFNA50 within a 3.8 cM region delimited by markers D7S1875 and D7S2519.
- Four deafness loci (DFNB14, DFNB4, DFNB17, and DFNB13) were previously mapped to chromosome 7q, but their genetic intervals do not overlap with that of DFNA50, which is located 3.8 cM distal to DFNB17 and 13.7 cM proximal to DFNB13.
- Sequencing of two candidate genes, SMOH and UBE2H, within the DFNA50 interval did not reveal the cause of deafness in this family.

inspection of publicly available sequence data (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Flanking primers were designed for PCR amplification of this STR. The amplicon was confirmed as a polymorphic microsatellite marker and deposited into the GDB database (<http://www.gdb.org>), being assigned the number D7S3304 (GDB:11511396). The order of markers used in this work was established by integrating genetic and physical maps (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Fluorescently labelled alleles were analysed in an ABI PRISM 310 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Linkage analysis was performed using the LINKAGE 5.1 software package.⁶ Two point LOD scores between the deafness locus and each marker were calculated under a

Abbreviations: NSSHI, non-syndromic sensorineural hearing impairment; AD, autosomal dominant; STR, short tandem repeat

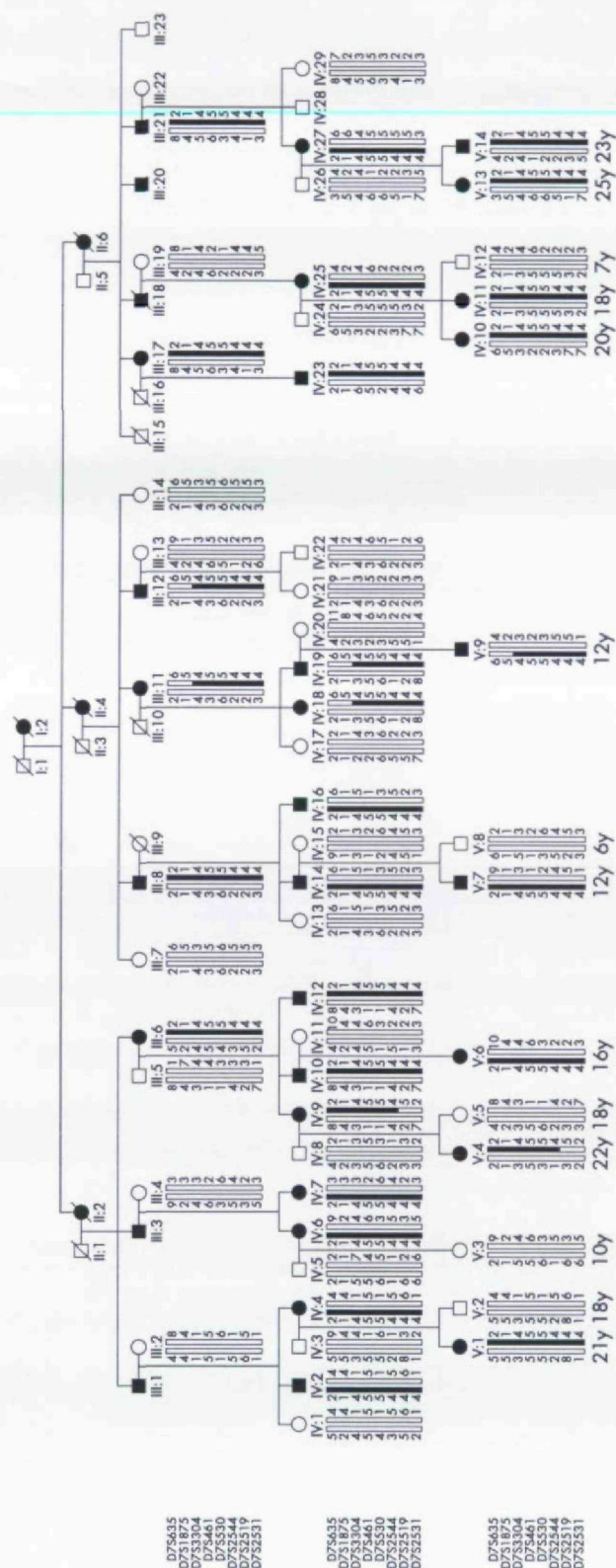


Figure 1 Pedigree and haplotype analysis of the Spanish family S403. Black symbols represent affected subjects. Haplotypes are represented by bars, with the haplotype associated with the hearing loss in black. The ages of youngest individuals are indicated below the haplotype.

fully penetrant autosomal dominant mode of inheritance, setting the disease allele frequency to 0.00001 and considering marker allele frequencies equal to each other.

DNA sequencing analysis

Primers were designed for the amplification of coding regions and exon intron boundaries of the SMOH (MIM 601500) and

UBE2H (MIM 601082) genes. PCR was performed by standard procedures as previously described.⁷ Heteroduplex analysis was carried out in MDE gels (BioWhittaker, Rockland, ME, USA) according to the manufacturer's protocol. Sequences of PCR products were analysed in an automated DNA sequencer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

RESULTS AND DISCUSSION

Clinical features

Affected family members showed a bilateral, symmetrical, progressive NSSHL. The earliest clinical evidence of hearing loss in the family was obtained for subjects V:7 and V:9, at the age of 12 years. Initially the hearing loss was mild, affecting all frequencies, but it later progressed to severe or profound in the seventh decade (fig 2). Linear regression analysis, based on all available audiograms of affected subjects, showed a 1.2 dB/year age linked progression of the hearing loss at all frequencies (data not shown). No evidence of vestibular dysfunction was found in affected subjects. Patient III:12 referred to episodes of bilateral tinnitus.

Linkage analysis

For linkage analysis, 52 members of the family were considered informative. Subjects V:3, V:8, and V:12 were only 10, 6, and 7 years old, respectively, below the age of onset of the hearing loss in the family, and therefore they were not included.

Initially, we tested the family for linkage to all described loci responsible for ADNSSL, using the markers listed in the Hereditary Hearing Loss Homepage in each case.⁴ In all cases negative results were obtained, indicating the involvement of a novel locus responsible for the hearing loss in this family. Therefore, a genome wide scan was performed to map the deafness locus, using a set of 394 microsatellite markers with an average spacing of 10 cM. Significant linkage was found only to marker D7S530 (maximum two point LOD score of 10.66 at $\theta = 0$) on chromosome 7q32 (fig 3). To confirm linkage, the family was then genotyped for markers flanking D7S530. Significant LOD scores at $\theta = 0$ were found for markers D7S3304, D7S461, and D7S2544 (table 1). Extensive alterations of the disease gene frequency or the allele frequencies of microsatellite markers did not change the conclusions of the analysis. The position of the novel deafness locus, DFNA50, was delimited by analysis of the

recombinant haplotypes in subjects III:11, III:12, and IV:9. This analysis placed DFNA50 between the proximal marker D7S1875 and the distal marker D7S2519, which define a critical interval of 3.8 cM (figs 1 and 3).

Four recessive loci for hearing impairment, DFNB14,⁸ DFNB4,⁹⁻¹¹ DFNB17,¹² and DFNB13¹³ map to chromosome 7q. As shown in fig 3, the DFNA50 critical interval does not overlap with those from the previously mapped loci, and it is localised 3.8 cM distal to DFNB17 and 13.7 cM proximal to DFNB13.

Candidate gene analysis

No genes for syndromic deafness are located within the DFNA50 critical interval. The human chromosome region containing DFNA50 shares conserved synteny with a segment of mouse chromosome 6, but no mutation causing hearing impairment in mice has been mapped to this region. This interval spans a physical distance of about 2.2 Mb, and includes 21 known genes and a series of predicted or poorly characterised genes according to the annotation in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). Using a candidate gene approach, UBE2H (MIM 601082) and SMOH (MIM 601500) were selected for our screening of mutations (fig 3).

UBE2H is expressed in human cochlea (Unigene cluster, Hs.372758) and consists of 7 exons.¹⁴ It encodes the ubiquitin conjugating enzyme E2H. This class of enzymes is involved in a major pathway for protein degradation in eukaryotes, by catalysing the covalent attachment of ubiquitin to defined lysine residues of proteolytic substrates. This forms ubiquitin protein conjugates that are degraded by the 26S proteasome. Ubiquitin conjugation is highly selective and is required for a variety of cellular functions, such as DNA repair, cell cycle progression, and heat shock resistance.¹⁵⁻¹⁷ The E2H enzyme is capable of ubiquitinating histones in the laboratory.¹⁴ Although the functional role of E2H in the cochlea remains uncertain, functional alteration of the ubiquitin pathway has been implicated in the aetiology of neurodegeneration.¹⁸ Furthermore, expression of UBE3B, another member of the ubiquitin ligase family, is highly induced immediately after noise trauma in the chick basilar papilla.¹⁹

It has been reported that SMOH, a human homologue of the *Drosophila* Smo gene, is expressed in the cochlea (Unigene cluster, Hs.197366). This gene, consisting of 12 exons,²⁰ encodes the transmembrane protein smoothened (Smo) that mediates the cellular response to the Hedgehog signalling molecule, a key agent in patterning numerous types of tissues.²¹ It has been documented that Hedgehog signalling is required for the correct morphogenesis of the inner ear, a complex process where inductive signals are necessary to transform the simple otic placode into the auditory and vestibular components of the inner ear.²²⁻²⁴

Screening for mutations in these two genes was performed by heteroduplex analysis and DNA sequencing of the exons and flanking regions in the affected subject III:8. This analysis only revealed three silent polymorphic changes in the SMOH open reading frame: 1137G>A in exon 5; 1164C>G in exon 6 (NCBI SNP cluster id: rs2703092); and 1722T>C in exon 10 (NCBI SNP cluster id: rs2016607).

Mapping of the novel DFNA50 locus further confirms the great genetic heterogeneity underlying the autosomal dominant forms of hereditary deafness. Reports of more families with hearing impairment linked to this novel locus should contribute to the identification of the responsible gene, providing insights into the auditory function and the molecular pathophysiology of age related hearing loss.

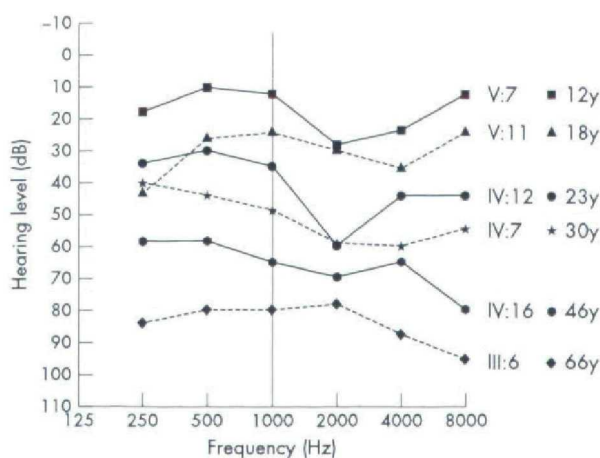


Figure 2 Audiograms showing the air conduction values obtained from six different affected subjects. Each graph point represents the average hearing loss for the right and left ears.

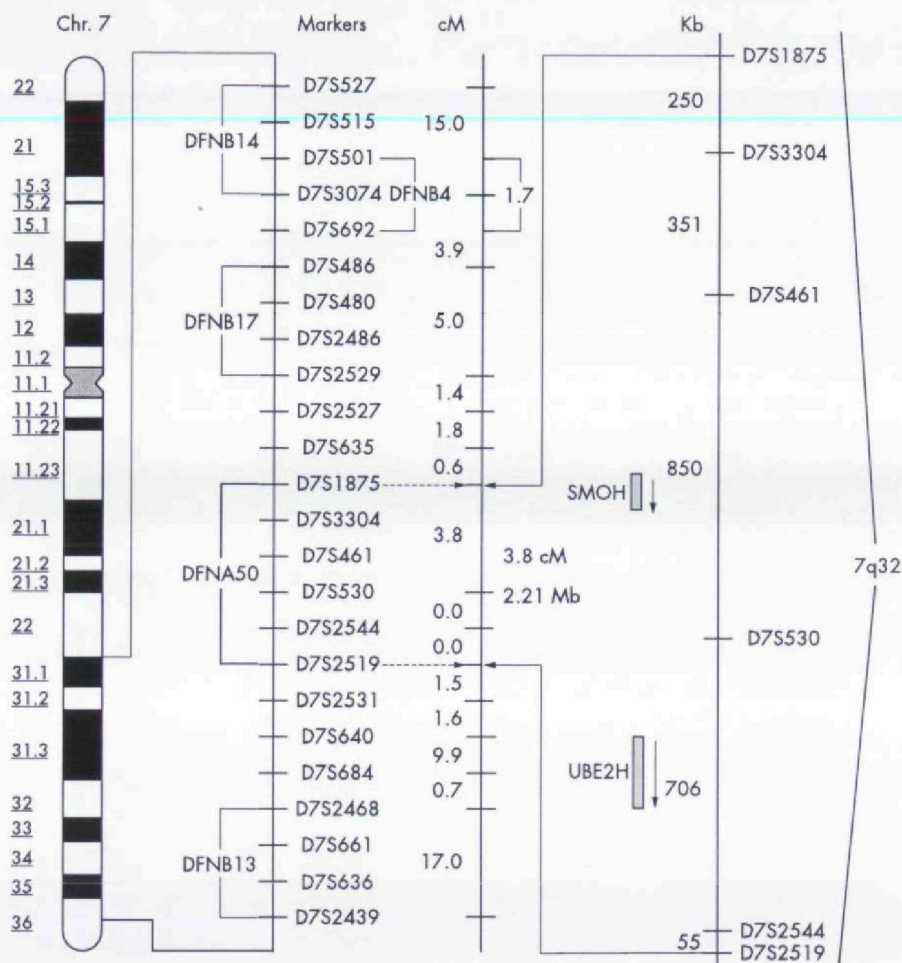


Figure 3 Physical and genetic maps of the 7q31–36 chromosomal region showing the localisation of DFNA50 and DFNB14, DFNB4, DFNB17, and DFNB13 critical intervals. cM, centimorgan; Mb, megabase; Kb, kilobase; SMOH, (MIM 601500); and UBE2H, (MIM 601082). For clarity, the genetic and physical distances are not represented to scale.

Table 1 Two point LOD scores between 7q microsatellite markers and DFNA50

Marker	Recombination fractions (θ):							Z_{max}	θ_{max}
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40		
D7S515	—	−0.64	2.33	3.16	3.23	2.52	1.40	3.34	0.15
D7S486	—	0.22	2.51	3.09	2.97	2.23	1.14	3.16	0.13
D7S480	—	4.72	5.49	5.28	4.16	2.67	1.16	5.49	0.06
D7S2486	—	2.42	3.97	4.16	3.54	2.43	1.13	4.17	0.09
D7S2527	—	5.34	6.08	5.83	4.62	3.04	1.34	6.08	0.05
D7S635	—	6.22	6.92	6.61	5.25	3.49	1.64	6.92	0.05
D7S1875	—	5.67	6.39	6.12	4.84	3.20	1.50	6.39	0.05
D7S3304	5.04	4.94	4.54	4.02	2.94	1.87	0.88	5.04	0.00
D7S461	6.08	5.98	5.58	5.05	3.93	2.72	1.41	6.08	0.00
D7S530	10.66	10.48	9.75	8.81	6.78	4.55	2.17	10.66	0.00
D7S2544	9.60	9.44	8.79	7.93	6.11	4.12	1.98	9.60	0.00
D7S2519	—	9.09	9.02	8.32	6.47	4.31	1.98	9.20	0.02
D7S2531	—	9.27	9.20	8.50	6.64	4.45	2.07	9.38	0.02
D7S640	—	7.29	7.97	7.63	6.19	4.29	2.07	7.97	0.05
D7S684	—	3.27	4.20	4.18	3.47	2.39	1.13	4.25	0.07
D7S661	—	0.73	3.59	4.27	3.98	2.89	1.35	4.32	0.13
D7S636	—	−6.78	−1.05	0.93	2.08	1.97	1.22	2.14	0.23

Markers used for the fine mapping analysis are in bold.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the Spanish family, whose participation made this study possible. This work was supported by grants from the

Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología CICYT-SAF 99-0025, the Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF 2002-03966, and the European Community QLG2-CT-1999-0098.

Authors' affiliations

S Modamio-Højbjerg*, **M A Moreno-Pelayo***, **A Mencía**, **I del Castillo**,
F Moreno, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal,
 Madrid, Spain

S Chardenoux, **C Petit**, Unité de Génétique des Déficiences Sensoriels,
 CNRS URA 1968, Institut Pasteur, Paris, France

D Morais, Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario,
 Valladolid, Spain

M Lathrop, Centre National de Génotypage, Evry, France

*These authors contributed equally to this work and the order of
 authorship is arbitrary.

SMH and AM were fellows at the Ministerio de Ciencia y Tecnología and
 Fondo de Investigaciones Sanitarias, respectively.

Correspondence to: Dr F Moreno, Unidad de Genética Molecular,
 Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km 9, 28034, Madrid,
 Spain; fmoreno.hrc@salud.madrid.org

Accepted 18 August 2003

REFERENCES

- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16-31.
- Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:1-16.
- Bom SJ, Kunst HP, Huygen PL, Cremers FP, Cremers CW. Non-syndromal autosomal dominant hearing impairment: ongoing phenotypical characterization of genotypes. *British Journal of Audiology* 1999;33:335-48.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage July 2003. <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152-4.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 1985;37:482-98.
- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menéndez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002;346:243-9.
- Mustapha M, Salem N, Weil D, el-Zir E, Loiselet J, Petit C. Identification of a locus on chromosome 7q31, DFNB14, responsible for prelingual sensorineural non-syndromic deafness. *Eur J Hum Genet* 1998;6:548-51.
- Baldwin CT, Weiss S, Farrer LA, De Stefano AL, Adair R, Franklyn B, Kidd KK, Korostishevsky M, Bonne-Tamir B. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population. *Hum Mol Genet* 1995;4:1637-42.
- Coucke P, Van Camp G, Demirhan O, Kabakçaya Y, Balemans W, Van Hauwe P, Van Agtmael T, Smith RJ, Parving A, Bolder CH, Cremers CW, Willems PJ. The gene for Pendred syndrome is located between D7S501 and D7S692 in a 1.7-cM region on chromosome 7q. *Genomics* 1997;40:48-54.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1998;18:215-17.
- Greinwald Jr JH, Wayne S, Chen AH, Scott DA, Zbar RI, Kraft ML, Prasad S, Ramesh A, Coucke P, Srisailapathy CR, Lovett M, Van Camp G, Smith RJ. Localisation of a novel gene for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome region 7q31. *Am J Med Genet* 1998;78:107-13.
- Mustapha M, Chardenoux S, Nieder A, Salem N, Weissenbach J, el Zir E, Loiselet J, Petit C. A sensorineural progressive autosomal recessive form of isolated deafness, DFNB13, maps to chromosome 7q34-q36. *Eur J Hum Genet* 1998;6:245-50.
- Kaiser P, Seufert W, Hofferer L, Kofler B, Sachsenmaier C, Herzog H, Jentsch S, Schweiger M, Schneider R. A human ubiquitin-conjugating enzyme homologous to yeast UBC8. *J Biol Chem* 1994;269:8797-802.
- Finley D, Chau V. Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:25-69.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 1992;61:761-807.
- Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 1992;26:179-207.
- Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T, Wada K. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* 1999;23:47-51.
- Lomax MI, Huang L, Cho Y, Gong TL, Altschuler RA. Differential display and gene arrays to examine auditory plasticity. *Hear Res* 2000;147:293-302.
- Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998;391:90-2.
- Nybakken K, Perrimon N. Hedgehog signal transduction: recent finding. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:503-11.
- Hammond KL, Loynes HE, Folarin AA, Smith J, Whitfield TT. Hedgehog signalling is required for correct anteroposterior patterning of the zebrafish otic vesicle. *Development* 2003;130:1403-17.
- Riccomagno MM, Martinu L, Mulheisen M, Wu DK, Epstein DJ. Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic Hedgehog. *Genes Dev* 2002;16:2365-78.
- Liu W, Li G, Chien JS, Raft S, Zhang H, Chiang C, Frenz DA. Sonic Hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. *Dev Biol* 2002;248:240-50.

INVESTIGACIÓN CLÍNICA

PREVALENCIA DE LA MUTACIÓN A1555G EN EL ADN MITOCONDRIAL EN PACIENTES CON PATOLOGÍA AUDITIVA O VESTIBULAR DEBIDA A LA OTOTOXICIDAD DE LOS AMINOGLUCÓSIDOS

J. GALLO-TERÁN¹, B. ARELLANO², C. MORALES-ANGULO³, S. MODAMIO-HØYBJØR⁴,
M. Á. MORENO-PELAYO⁴, R. RAMÍREZ-CAMACHO², I. DEL CASTILLO⁴, F. MORENO⁴

¹SERVICIO DE ORL. HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA. SANTANDER. ²SERVICIO DE ORL. HOSPITAL PUERTA DE HIERRO. MADRID. ³SERVICIO DE ORL. HOSPITAL SIERRALLANA. TORRELAVEGA. ⁴UNIDAD DE GENÉTICA MOLECULAR. HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL. MADRID.

RESUMEN

O *bj*etivos: determinar la frecuencia de la mutación A1555G del genoma mitocondrial en pacientes españoles con ototoxicidad por aminoglucósidos. *Pacientes y métodos*: se estudiaron 25 casos independientes, con un total de 39 individuos con patología auditiva o vestibular causada por la ototoxicidad de los aminoglucósidos. De ellos, 18 pertenecían a 4 familias no relacionadas con historia de ototoxicidad por aminoglucósidos en más de un miembro de la familia, 8 sujetos pertenecían a 8 familias en las que había otros miembros con hipoacusia sin exposición a aminoglucósidos, y 13 eran casos esporádicos. Entre los 13 casos esporádicos, había 3 pacientes con

afectación vestibular, sin hipoacusia. Los 36 individuos restantes presentaban daño coclear. Se realizó la detección de la mutación A1555G mediante técnicas de diagnóstico molecular. *Resultados*: se identificó la mutación A1555G en todos los individuos de las 4 familias con daño auditivo por aminoglucósidos y en 6 de los 8 individuos con historia familiar de hipoacusia. Ninguno de los casos esporádicos portaba la mutación. *Conclusiones*: una alta proporción de los pacientes con daño auditivo debido a la ototoxicidad de los aminoglucósidos y que tienen antecedentes familiares de hipoacusia (relacionada o no con ototoxicidad) portan la mutación A1555G.

PALABRAS CLAVE: Ototoxicidad. Aminoglucósidos. Hipoacusia. Mutación A1555G. Genoma mitocondrial.

ABSTRACT

PREVALENCE OF THE A1555G MUTATION IN THE MITOCHONDRIAL DNA IN PATIENTS WITH COCHLEAR OR VESTIBULAR DAMAGE DUE TO AMINOGLYCOSIDE-INDUCED OTOTOXICITY

O *bj*ective: to determine the frequency of the A1555G mutation in the mitochondrial genome among Spanish patients with aminoglycoside-induced ototoxicity. *Patients and methods*: we screened 25 unrelated cases, totalling 39 individuals with cochlear or vestibular damage due to aminoglycoside-induced ototoxicity. This group was made up of 18 subjects from 4 unrelated families with a history of aminoglycoside ototoxicity in more than one relative, 8 subjects from 8 families that also had other relatives with hearing loss in absence of aminoglycoside exposure, and 13 sporadic cases. Among the 13

sporadic cases, there were 3 patients with vestibular involvement. Detection of the A1555G mutation was seen by mean of techniques for molecular diagnosis. *Results*: the A1555G mutation was identified in all of the individuals from 4 families with aminoglycoside-induced cochlear damage and in 6 of 8 individuals with familial hearing loss. None of the sporadic cases carried the mutation. *Conclusions*: a high proportion of patients with cochlear damage due to aminoglycoside ototoxicity and having a familial history of hearing loss, related or not to aminoglycoside exposure, harbor the A1555G mutation.

KEY WORDS: Ototoxicity. Aminoglycoside. Hearing loss. A1555G mutation. Mitochondrial genome.

Correspondencia: Carmelo Morales Angulo. Alto de Veneras, 8. 39478 Puente Arce. Cantabria.

E-mail: cmorales@mundivia.es

Fecha de recepción: 9-5-2002

Fecha de aceptación: 25-2-2003

INTRODUCCIÓN

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan produciendo errores en la síntesis de proteínas al unirse selectivamente al RNA ribosómico (rRNA) 16S bacteriano¹. Aunque la administración de dosis elevadas de aminoglucósidos durante periodos prolongados de tiempo produce ototoxicidad en la mayor parte de los individuos, existe un componente genético que determina una mayor susceptibilidad al efecto ototóxico de dosis bajas de estos antibióticos². La mutación A1555G en el gen del rRNA 12S del genoma mitocondrial es responsable de hipoacusia no sindrómica, así como de un incremento en la susceptibilidad a la acción ototóxica de los aminoglucósidos³. Parece que la mutación A1555G aumenta la similitud del rRNA 12S humano con su homólogo 16S bacteriano, produciendo un incremento en la unión del antibiótico^{3,4}. La alta concentración que alcanzan los aminoglucósidos en la endolinfa y en la perilinfa provocaría un mayor daño en las células del oído interno⁵.

La mutación A1555G se ha encontrado en numerosas familias de diferentes países, y especialmente en España, donde está presente aproximadamente en el 15-20% de los casos familiares de hipoacusia no sindrómica, independientemente del patrón de herencia y de la edad de inicio^{6,7,8}. Esta mutación es transmitida por las madres a todos sus descendientes, tanto varones como mujeres⁹. Se estima que el 17-33% de los pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos son portadores de la mutación A1555G^{2,10,11}.

El objetivo de nuestro estudio es determinar la prevalencia de la mutación A1555G en pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos en nuestro medio.

PACIENTES Y MÉTODOS

Un total de 39 individuos españoles con patología auditiva o vestibular debida a ototoxicidad por aminoglucósidos fueron incluidos en nuestro estudio. De ellos 22 (56,4%) eran varones y 17 (43,6%) mujeres. Las edades de los pacientes estaban comprendidas entre los 13 y los 79 años, con una media de 44 años. En 13 sujetos no existían antecedentes familiares de ototoxicidad por aminoglucósidos ni de hipoacusia, es decir, se trataba de casos esporádicos. Ocho pacientes pertenecían a 8 familias no relacionadas en las que había otros miembros con hipoacusia, aunque sin aparente exposición a aminoglucósidos.

El resto (18 individuos) pertenecían a 4 familias en las que había al menos dos miembros con ototoxicidad por aminoglucósidos. En 36 casos (92,3%) se trataba de toxicidad coclear y en 3 (7,7%) vestibular (estos últimos todos esporádicos).

Los datos clínicos obtenidos de cada paciente fueron los siguientes: aminoglucósido implicado, edad en el momento de la administración, edad de inicio de la hipoacusia o de la clínica vestibular, modo de aparición (brusco o progresivo), tipo de curva audiométrica¹² e intensidad de la hipoacusia¹³, presencia de acúfenos o inestabilidad-mareo-vértigo. En la mayor parte de los casos no fue posible determinar otros factores de riesgo de ototoxicidad, como la dosis total de aminoglucósido administrada, niveles plasmáticos del antibiótico alcanzados, alteraciones en la función renal o presencia de otras patologías concomitantes. Los criterios de inclusión fueron definidos como una historia de exposición a aminoglucósidos seguida por hipoacusia o vértigos, sin otra causa definida para los mismos.

Se obtuvo consentimiento informado para el análisis genético de todos los pacientes que participaron en el estudio. El test para la detección de la mutación A1555G se realizó según el protocolo previamente descrito¹⁴.

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS 8.0 para Windows.

RESULTADOS

En 33 pacientes se pudo determinar el aminoglucósido implicado en la ototoxicidad. En 29 casos (74,4%) se trataba de estreptomycin, en 3 (7,7%) gentamicina (todos ellos esporádicos, dos con toxicidad vestibular), y en uno (2,6%) amikacina (en un caso esporádico). La edad de inicio de la ototoxicidad fue en 18 pacientes (46,2%) antes de los 5 años de edad, en 5 (12,8%) entre los 6 y los 10 años, en 5 (12,8%) entre los 11 y los 30 años, en 6 (15,4%) después de los 30 años, y desconocida en 5 casos (12,8%). De los pacientes con ototoxicidad coclear se conocía el modo de inicio en 28, de los cuales era brusco (horas o pocos días después de la administración del aminoglucósido) en 21 (75%) y progresivo en 7 (25%). En los tres casos de ototoxicidad vestibular el modo de aparición fue progresivo. La intensidad de la hipoacusia fue en 2 casos (5,1%) ligera, en 7 (17,9%) moderada, en 17 (43,6%) severa y en 10 (25,6%) profunda. El perfil audiométrico fue en 9 pacientes (23%) muy descendente, en 11 (28,2%)

Tabla 1: Presencia de la mutación A1555G según si existen antecedentes familiares de hipoacusia o de ototoxicidad por aminoglucósidos y según si hay afectación coclear o vestibular

	Casos esporádicos	Casos con AF de hipoacusia	Familias con AF de ototoxicidad
Toxicidad coclear	0/10	6/8	4/4
Toxicidad vestibular	0/3	0/0	0/0
Total	0/13 (0%)	6/8 (75%)	4/4 (100%)

AF = antecedentes familiares.

moderadamente descendente, en 4 (10,3%) plano y en 12 (30,8%) residual.

Referían acúfenos continuos 28 pacientes (71,8%), y en 5 casos (12,8%) mareo/vértigo continuo o recurrente (incluyendo los 3 pacientes con ototoxicidad vestibular). En ninguno de los otros dos pacientes que referían mareo/vértigo persistente se demostró que el aminoglucósido fuese el causante del mismo, dada la aparición del mareo años después de la exposición al ototóxico y sin tratarse de cuadros compatibles con hipofunción vestibular bilateral.

El estudio genético mostró la presencia de la mutación A1555G en 24 pacientes (61,5%) (tabla 1). Los 18 individuos (100%) pertenecientes a 4 familias con antecedentes de ototoxicidad por aminoglucósidos eran portadores de la mutación. De los 8 casos con antecedentes familiares de hipoacusia portaban la mutación 6 pacientes (75%). Ninguno de los 13 casos esporádicos de ototoxicidad presentaba la mutación, incluidos los 3 casos de toxicidad vestibular. De los 24 pacientes portadores de la mutación A1555G se cono-

cía el aminoglucósido administrado en 20 (83,3%), tratándose en todos los casos de estreptomycin.

Al comparar a los pacientes que presentaban la mutación A1555G del ADN mitocondrial con los no portadores de la misma no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad de inicio, modo de aparición, presencia de acúfenos, intensidad de la hipoacusia ni perfil audiométrico ($p>0,05$) (tabla 2).

Los potenciales evocados auditivos realizados a 3 pacientes portadores de la mutación A1555G demostraron afectación coclear. Estudios de imagen realizados a un paciente con la mutación (resonancia magnética) y a 3 pacientes con toxicidad coclear no portadores (tomografía computerizada y resonancia magnética) fueron normales.

DISCUSIÓN

La mutación A1555G en el gen del rRNA 12S es responsable de una alta proporción de los casos de ototoxicidad por aminoglucósidos en la población española. En la tabla 3 pueden compararse los resultados de nuestro trabajo con otros publicados previamente, analizados en función de la existencia o no de antecedentes familiares de ototoxicidad por aminoglucósidos¹⁵⁻²². Se observa que la mayor parte de los pacientes que tienen antecedentes familiares de ototoxicidad son portadores de la mutación. Los casos que no presentan antecedentes familiares de ototoxicidad, pero sí historia familiar de hipoacusia por vía materna, también son muy sugestivos de ser debidos a la mutación A1555G. Algunos estudios han encontrado también la mutación A1555G en un número no despreciable de casos esporádi-

Tabla 2: Resultados y análisis estadístico respecto a la edad y modo de inicio de la hipoacusia, presencia de acúfenos y severidad de la pérdida auditiva en los pacientes según si son portadores de la mutación A1555G o no

	Edad de inicio		Modo de inicio		Acúfenos		Severidad	
	< 5 años	> 5 años	Brusco	Progres.	No	Sí	L-Mod.	S-Prof.
A1555G	12	10	19	4	16	8	4	20
Negativ.	6	6	2	3	12	3	5	7
Test Fisher	p=0,54		p=0,082		p=0,30		p=0,112	

Progres = progresivo. L-Mod = ligera-moderada. S-Prof = severa-profunda. Negativ = negativo.

Tabla 3: Prevalencia de la mutación A1555G en pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos, según si existen antecedentes familiares de ototoxicidad

Autor (año)	País	Esporádicos o AF hipoacusia	AF ototoxicidad	AG
Prezant (1993)	China		3/3 (100%)	Estreptomina
F-Ghodsian (1993)	China	1/36 (2,7%)		No precisa
Hutchin (1993)	Japón	4/78 (5,1%)	2/2 (100%)	No precisa
F-Ghodsian (1997)	EEUU	3/37 (8,1%)	4/4 (100%)	Estreptomina
Usami (1997)	Japón		5/5 (100%)	No precisa
Tsuiki (1997)	Japón		3/3 (100%)	Dihidroestrep.
Pandya (1997)	Mongolia		2/3 (66,6%)	Estreptomina
El-Schahawi (1997)	España		2/2 (100%)	No precisa
Gardner (1997)	Sudáfrica		1/1 (100%)	Estreptomina
Estivill (1998)	España		12/12 (100%)	No precisa
Usami (1998)	Japón	1/1 (100%)	1/1 (100%)	Isepamicina
Yuan (1999)	China	0/7 (0%)	2/2 (100%)	No precisa
Shohat (1999)	Israel		1/1 (100%)	Estreptomina
Zhang (1999)	China	6/48 (12,5%)		No precisa
Morales (1999)	España		1/1 (100%)	Estreptomina
Ke (1999)	China		5/9 (55,5%)	No precisa
Usami (2000)	Japón	20/43 (46,5%)		No precisa
Zhang (2001)	China		2/2 (100%)	No precisa
Morales (2002)	España		4/4 (100%)	Estreptomina
Nuestro estudio	España	6/21 (28,5%)	4/4 (100%)	Estreptomina

AF = antecedentes familiares. AG = aminoglucósido.

cos de ototoxicidad por aminoglucósidos^{10,23,24}. Hay que tener en cuenta que, en ausencia de exposición a aminoglucósidos, la mayor parte de los portadores de la mutación A1555G tienen una audición normal o desarrollan más tarde una pérdida auditiva ligera, similar a la producida por la presbiacusia, que puede pasar desapercibida²⁵⁻²⁷.

En dos individuos que tenían antecedentes familiares de hipoacusia no se detectó la mutación A1555G. Se han encontrado otras mutaciones responsables de ototoxicidad familiar por aminoglucósidos, que podrían ser las responsables de estos casos. Bacino et al.²⁸ analizaron 35 pacientes chinos con ototoxicidad por aminoglucósidos y sin la mutación A1555G, encontrando 3 cambios en la secuencia del gen del rRNA 12S, de los cuales uno podría ser una mutación patogénica: la delección de una timina en la posición 961, con varias inserciones de citosinas. Posteriormente se ha en-

contrado esta misma mutación en otros pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos²⁹⁻³¹. Tessa et al.³², analizando 80 niños con sordera en busca de mutaciones en el ADN mitocondrial, encontraron uno con hipoacusia severa-profunda y con dos familiares maternos con historia de hipoacusia inducida por aminoglucósidos en el que identificaron la mutación T1095C, también en el gen del rRNA 12S.

Todos los aminoglucósidos son capaces de afectar en mayor o menor grado la función coclear y vestibular³³. En la mayor parte de los individuos portadores de la mutación A1555G descritos, el aminoglucósido desencadenante ha sido la estreptomina. A diferencia de otros países, en los que su uso ha sido más restringido, la estreptomina fue utilizada con frecuencia en España en la década de los 70 para tratar infecciones banales de las vías aéreas superiores. Este es uno de los motivos que han podido con-

tribuir a detectar numerosos casos de ototoxicidad en nuestro país. Se han descrito casos aislados en los que aparecen implicados otros aminoglucósidos, como la isepamicina³⁴. En nuestro trabajo el aminoglucósido responsable de la ototoxicidad en los individuos con la mutación A1555G fue la estreptomycin.

Gracias a la aparición de antibióticos con menos efectos secundarios ha disminuido la utilización de los aminoglucósidos, aunque todavía se emplean con frecuencia en el medio hospitalario. La hipoacusia desarrollada por aminoglucósidos se ha relacionado únicamente con los de administración inyectable. Sin embargo, son muchos los aminoglucósidos que han estado durante años, y todavía actualmente, incluidos en preparados comerciales de administración por vía oral para diversas patologías. La gran heterogeneidad en la severidad de la hipoacusia en individuos con la mutación A1555G, incluso dentro de una misma familia, podría deberse a que en algunos pacientes mínimas absorciones del aminoglucósido de estos preparados pueda haber contribuido a una mayor progresión de la sordera. No se pueden descartar otros factores ambientales o genes nucleares que actúen como modificadores de la intensidad de la pérdida auditiva^{2,35-37}.

Los individuos portadores de la mutación generalmente desarrollan la pérdida auditiva en horas o días tras la administración del antibiótico. Usami et al. encontraron que en 9 pacientes con la mutación A1555G la sordera apareció entre 1 día y 3 meses después de la administración del aminoglucósido²⁵. Además vieron que la severidad de la hipoacusia no tenía relación con la edad en el momento de la administración. En algún paciente incluso la sordera tuvo lugar tras una sola inyección del aminoglucósido. Sin embargo, en ocasiones al principio únicamente aparecen acúfenos, y la hipoacusia se desarrolla progresivamente a lo largo de varios años, encontrándose casos en los que el diagnóstico se produjo 17 años después de recibir el aminoglucósido¹⁰. De acuerdo con los resultados de otros trabajos, la mayor parte de los individuos portadores de la mutación A1555G que han recibido aminoglucósidos presentan una hipoacusia de intensidad severa-profunda, con mayor afectación de los tonos agudos^{10,25,38}. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes portadores de la mutación y los que no la presentaban en cuanto a la edad de inicio de la hipoacusia, a la intensidad de la pérdida auditiva, ni al perfil audiométrico.

En nuestro estudio ninguno de los pacientes portadores de la mutación A1555G presentaban mareo o vértigo que pudiesen ser atribuibles al efecto ototóxico de los aminoglucósidos. En ninguno de los 3 pacientes con ototoxicidad vestibular se detectó la mutación A1555G. Típicamente, la ototoxicidad de la estreptomycin se caracteriza por una afectación más severa y precoz del sistema vestibular que de la cóclea. Aunque se desconoce el motivo, existe evidencia de que la ototoxicidad en los pacientes con la mutación A1555G está limitada a la cóclea, sin afectar el sistema vestibular^{2,39}. Los estudios de función vestibular exhaustivos realizados a pacientes portadores de la mutación con hipoacusia profunda después de recibir estreptomycin fueron normales^{25,40}. Coincidiendo con los resultados de otros trabajos, los potenciales evocados auditivos realizados a pacientes portadores de la mutación A1555G muestran una afectación coclear, y en las pruebas de imagen no aparecen alteraciones en el oído^{25,40}.

Como conclusión, la mutación A1555G es una causa frecuente de ototoxicidad por aminoglucósidos en la población española. Por el momento, la principal aplicación clínica de la detección de esta mutación está en prevenir la hipoacusia por aminoglucósidos. Por lo tanto, antes de administrar estos antibióticos a un paciente, es muy importante realizar una anamnesis detallada en busca de antecedentes familiares de ototoxicidad o de hipoacusia por vía materna. De igual modo, debería realizarse un estudio genético para descartar la presencia de la mutación A1555G a todo paciente con ototoxicidad por aminoglucósidos. La presencia de la mutación contraindicaría estos antibióticos en todos los familiares por vía materna.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a los miembros de las familias estudiadas y a las personas que han colaborado en la realización de este trabajo. Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Red de Grupos "Bases genéticas y moleculares de los trastornos de la audición", expediente G03/203). J.G-T. y S.M-H. son beneficiarios, respectivamente, de un contrato concedido por la Sociedad Española de ORL dentro del Programa de Difusión de la Investigación del Instituto de Salud "Carlos III", y de una beca del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

REFERENCIAS

- 1.- Gravel M, Melancon P, Brakier-Gingras L. Cross-linking of streptomycin to the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1987; 26: 6227-32.
- 2.- Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 28: 99-109.
- 3.- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993; 4: 289-94.
- 4.- Hamasaki K, Rando RR. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* 1997; 36: 12323-8.
- 5.- Henley CM, Schacht C. Pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics in blood, inner-ear fluids and tissues and their relationship to ototoxicity. *Audiology* 1988; 27: 137-46.
- 6.- Sarduy M, del Castillo I, Villamar M, Romero L, Herraiz C, Hernández FJ, et al. Genetic study of mitochondrially inherited sensorineural hearing impairment in eight large families from Spain and Cuba. En: "Developments in Genetic Hearing Impairment", Stephens D, Read A, Martini A (eds.). Whurr Publishers, Londres, 1998. Capítulo 22, páginas 121-5.
- 7.- Estivill X, Govea N, Barceló A, Pelleró E, Badenas C, Romero E, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 27-35.
- 8.- Kupka S, Toth T, Wrobel M, Zeissler U, Szyfyer W, Szyfyer K, et al. Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian and Polish patients. *Hum Mutat* 2002; 19: 308-9.
- 9.- Hu D-N, Qiu W-Q, Wu B-T, Fang L-Z, Zhou F, Gu Y-P, et al. Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. *J Med Genet* 1991; 28: 79-83.
- 10.- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Chaitrow W, Wendt KA, Nelson A, Arnos KS, et al. Mitochondrial gene mutation is a common predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol* 1997; 18: 173-8.
- 11.- Usami S, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, Ishii M, et al. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet* 2000; 37: 38-40.
- 12.- Liu X, Xu L. Nonsyndromic hearing loss: an analysis of audiograms. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994; 103: 428-33.
- 13.- www.biap.org/biapespagnol/recom07015spain.pdf.
- 14.- Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Mazón A, Moreno F. Predisposición familiar a la ototoxicidad de los aminoglucósidos debido a la mutación A1555G del ADN mitocondrial. *Med Clin (Barc)* 2003; 121: 216-8.
- 15.- Yuan H, Jiang S, Yang W, Guo W, Cao J, Dai P. Screening for mitochondrial 1555(G) mutation in patients with aminoglycoside antibiotic-induced deafness. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 1999; 16: 141-4.
- 16.- Pandya A, Xia X, Radnaabazar J, Batsuuri J, Dangaansuren B, Fischel-Ghodsian N, et al. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity. *J Med Genet* 1997; 34: 169-72.
- 17.- el-Schahawi M, Lopez de Munain A, Sarrazin AM, Shanske AL, Basirico M, Shanske S, et al. Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic sensorineural deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12S rRNA gene: evidence of heteroplasmy. *Neurology* 1997; 48: 453-6.
- 18.- Morales-Angulo C, del Castillo I, Sarduy M, Villamar M, Mazón A, Moreno F. Hipoacusia familiar no síndromica transmitida por herencia mitocondrial. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1999; 50: 93-9.
- 19.- Zhang N, Qiao X, Wang L, Liang C. Mitochondrial DNA mutations in matrilineal nonsyndromic deafness pedigrees of southwest China. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Bao* 2001; 32: 596-8.
- 20.- Ke X, Qi Y, Gu Z, Zhang Z, Zhang W, Jiang S, et al. Aminoglycoside ototoxicity associated with mitochondrial DNA mutation. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 1999; 13: 195-7.
- 21.- Zhang L, Lu M, Huang Y, Zhou X, Qiu D, Wang W. The relation between mitochondrial DNA mutation and aminoglycoside antibiotics-induced deafness. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 1999; 16: 138-40.
- 22.- Morales-Angulo C, Gallo-Terán J, del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, García-Mantilla J, Moreno F. Características audiométricas de la hipoacusia familiar transmitida por herencia mitocondrial (A1555G). *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002; 53: 641-8.
- 23.- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Bu X, Oztas S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol* 1993; 14: 399-403.
- 24.- Hutchin T, Stoneking M, Qiu WQ, Fischel-Ghodsian N, Cortopassi G. Association of a particular point mutation of the mitochondrial DNA with aminoglycoside-induced deafness. *Am J Hum Genet* 1993; 53: A20.
- 25.- Usami S, Abe S, Kasai M, Shinkawa H, Moeller B, Kenyon J, et al. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope* 1997; 107: 483-90.
- 26.- Gardner JC, Goliath R, Viljoen D, Sellars S, Cortopassi G, Hutchin T, et al. Familial streptomycin ototoxicity in a South African family: a mitochondrial disorder. *J Med Genet* 1997; 34: 904-6.
- 27.- Shohat M, Fischel-Ghodsian N, Legum C, Halpern GJ. Aminoglycoside-induced deafness associated with the mitochondrial DNA mutation A1555G. *Am J Otolaryngol* 1999; 20: 64-7.
- 28.- Bacino C, Prezant TR, Bu X, Fournier P, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 165-72.
- 29.- Casano RAMS, Johnson DF, Hamon M, Bykhovskaya Y, Torricelli F, Bigozzi M, et al. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1999; 20: 151-56.
- 30.- Yoshida M, Shintani T, Hirao M, Himi T, Yamaguchi A, Kikuchi K. Aminoglycoside-induced hearing loss in a patient with the 961 mutation in mitochondrial DNA. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002; 64: 219-22.
- 31.- Tabg HY, Hutcheson E, Neill S, Drummond-Borg M, Speer M, Alford RL. Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: how many are at risk? *Genet Med* 2002; 4: 336-45.
- 32.- Tessa A, Giannotti A, Tieri L, Vilarrinho L, Marotta G, Santorelli FM. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mtDNA. *Europ J Hum Genet* 2001; 9: 147-9.
- 33.- Schacht J. Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am* 1993; 5: 845-56.
- 34.- Usami S, Abe S, Tono T, Komune S, Kimberling WJ, Shinkawa H. Isepamicin sulfate-induced sensorineural hearing loss in patients with the 1555 A-G mitochondrial mutation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1998; 60: 164-9.
- 35.- Abe S, Kelley PM, Kimberling WJ, Usami SI. Connexin 26 gene (GJB2) mutation modulates the severity of hearing loss associated with the 1555 A-G mitochondrial mutation. *Am J Med Genet* 2001; 103: 334-8.
- 36.- Bykhovskaya Y, Yang H, Taylor K, Hang T, Tun RY, Estivill X, et al. Modifier locus for mitochondrial DNA disease: linkage and linkage disequilibrium mapping of a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Genet Med* 2001; 3: 177-80.
- 37.- Li X, Li R, Lin X, Guan MX. Isolation and characterization of the putative nuclear modifier gene MTO1 involved in the pathogenesis of deafness-associated mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. *J Biol Chem* 2002; 277: 27256-64.
- 38.- Tsuiki T, Murai K, Murai S, Kitamura K, Tamagawa Y. Audiologic features of hearing loss due to the 1555 mutation of mitochondrial DNA. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 643-8.
- 39.- Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial deafness mutations reviewed. *Hum Mutat* 1999; 13: 261-70.
- 40.- Braverman I, Jaber L, Levi H, Adelman C, Amos KS, Fischel-Ghodsian N, et al. Audio-vestibular findings in patients with deafness caused by a mitochondrial susceptibility mutation and precipitated by an inherited nuclear mutation or aminoglycosides. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 1001-4.

